ORSAY

Série

N° d'ordre

155

THESE

PRESENTEE

à

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

le titre

de DOCTEUR de L'UNIVERSITE de PARIS

par

B. DESFOSSES

1ère THESE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES STEROIDES PHENOLIQUES PAR LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUE ET RADIO-IMMUNOLOGIQUE

Soutenue le 1 Octobre 1973 devant la Commission d'examen

MM.	LEDERER	Président
	FETIZON	Examinateurs
	JAYLE	Examinateurs
	BARBIER	Rapporteur

ORSAY

Série

N° d'ordre

155

THESE

PRESENTEE

à

L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

le titre

de DOCTEUR de L'UNIVERSITE de PARIS

par

B. DESFOSSES

1ère THESE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES STEROIDES PHENOLIQUES PAR LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUE ET RADIO-IMMUNOLOGIQUE

Soutenue le 1 Octobre 1973 devant la Commission d'examen

MM.	LEDERER	Président
	FETIZON	Examinateurs
	JAYLE	
	BARBIER	Rapporteur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA FEMME

A MES ENFANTS Veronique, Florence, Bénédicte

A MES PARENTS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544713_0018

AVANT PROPOS

Ce travail a pu être réalisé grâce à la compréhension et la constante bienveillance du Professeur M.F. JAYLE qui nous a accueilli dans son laboratoire de chimie biologique à la Faculté de Médecine. Nous tenons à lui exprimer notre profonde gratitude et notre admiration. Ses grandes connaissances et son enthousiasme scientifique nous ont donné un goût profond pour la recherche.

Nous remercions le Professeur E. LEDERER qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider ce Jury de thèse.

Nous remercions le Professeur M. FETIZON pour avoir bien voulu accepter de siéger à notre Jury de thèse.

Nos remerciements vont également au Docteur M. BARBIER pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail en tant que Rapporteur de cette thèse.

A Mademoiselle O. CREPY, je dis ma respectueuse gratitude pour ses encouragements et son aide.

Nous remercions également Mademoiselle N. CITTANOVA qui nous a encouragé à entreprendre la rédaction de ce travail et nous a beaucoup aidé par son dynamisme.

Enfin, outre R. ZELNIK et R. EMILIOZZI dont l'aide amicale et l'expérience nous furent très utiles, nous remercions tous nos collègues du Laboratoire pour leur amitié grâce à laquelle tout devient plus facile.

Mademoiselle J. BOURLIER a assuré avec compétence la transcription dactylographique du manuscrit. Nous l'en remercions bien vivement.

INTRODUCTION

Les estrogènes naturels sont des stéroïdes phénoliques qui dérivent d'un carbure en C_{18}, l'estratriène.

L'hormone naturelle est l'estradiol-17β qui est physiologiquement en équilibre avec l'estrone, les deux substances se transformant mutuellement l'une dans l'autre.

Les estrogènes prennent naissance au niveau des ovaires, des testicules, du placenta et de la corticosurrénale. Chez la femme, dans les conditions physiologiques normales, la thèque interne folliculaire constitue le lieu principal de biosynthèse des estrogènes. Au cours de la grossesse, le syncythium placentaire prend le relai et sa contribution en fin de grossesse est de 100 à 1.000 fois supérieure à celle des ovaires.

Au cours du métabolisme intermédiaire, les estrogènes subissent une série d'hydroxylations et de conjugaisons. Actuellement, on a isolé des fluides biologiques plus d'une vingtaine de stéroïdes phénoliques. Parmi ceux-ci, on trouve des stéroïdes oxygénés ou non, en position 16 et 17. Ce sont ces stéroïdes phénoliques qui ont fait l'objet des différentes parties de notre travail.

Avec les progestatifs, ces hormones contrôlent le développement des caractères sexuels et le fonctionnement physiologique des organes reproducteurs femelles des mammifères. Les propriétés biologiques des estrogènes ont pour base leur action sur l'endomètre en le rendant hyperplasique et sur le corps utérin en hypertrophiant les myofibrilles. Les stéroïdes provoquent la rétention hydrique dans

l'organisme et agissent sur différents métabolismes.

Etant donné l'importance de l'étude biochimique et physiologique de ces composés, de nombreuses méthodes ont été proposées pour l'analyse qualitative et quantitative des estrogènes dans les liquides d'excrétion, les tissus producteurs, les tissus récepteurs et le sang circulant.

Dans un premier temps, la plupart des études ont porté sur un milieu relativement riche en estrogènes, l'urine. Un certain nombre de méthodes physico-chimiques ont été proposées [(1)] ainsi que quelques méthodes biologiques se basant sur l'activité utérotrophique des estrogènes[(2)]. Plus récemment, les besoins de la recherche l'exigeant, les biochimistes se sont intéressés à l'étude de milieux plus pauvres en estrogènes, tels que le sang.

De nouvelles méthodes plus sensibles, ont alors été proposées comme la fluorescence, la chromatographie gazeuse, la double dilution isotopique et plus récemment la compétition de liaison à une protéine et le dosage radio-immunologique. Une des difficultés majeures de l'application de ces méthodes est la présence de contaminants interférant avec les stéroïdes au cours du dosage. Ces substances, très difficiles à éliminer, sont d'origine endogène ou exogène. Le biochimiste dont les problèmes à résoudre seront nombreux, devra disposer de méthodes d'identification et de purification simples, efficaces, variées et adaptables. En effet, il est toujours nécessaire, avant d'entreprendre le dosage d'un stéroïde en milieu biologique, de connaître les composés de structure voisine et susceptibles d'interférer dans ce dosage.

Dans le but de contribuer à la résolution de certains de ces problèmes le travail confié par le Professeur JAYLE et commencé en 1960 a pour objet :

- la constitution d'une collection de stéroïdes de référence par la synthèse de phénolstéroïdes oxygénés en position 16,17 ou en 16 et 17 et de différents dérivés éther-oxydes ou esters. En effet à l'époque où ce travail a été entrepris, fort peu de stéroïdes phénoliques étaient commercialisés. Comme il était nécéssaire de disposer dans le laboratoire d'une collection d'estrogènes de référence, nous avons été amené à effectuer la synthèse d'environ 80 stéroïdes ou différents dérivés éther-oxydes ou esters. Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé les méthodes décrites dans la littérature. Cependant, dans un souci de simplification, nous avons été amené à apporter un certain nombre de modifications. En particulier, nous avons recherché une voie commune pour effectuer la synthèse du plus grand nombre possible d'estrogènes.

- l'étude systématique de ces composés par différentes méthodes chromatographiques permettant leur purification et leur dosage. En effet, peu d'études systématiques concernant l'ensemble de ces stéroïdes avaient été effectuées. D'autre part, la formation de dérivés éther-oxydes ou esters, en modifiant profondément certains caractères physico-chimiques des estrogènes pouvait apporter des variantes intérèssantes au dosage de ces stéroïdes.

Parmi les dérivés étudiés nous en avons retenu deux, les méthyl-éthers et les acétates qui nous ont semblé particulièrement

intéressants en raïson de certaines de leurs caractéristiques.
En effet, ces composés sont très faciles à synthétiser d'une façon univoque et avec rendement élevé.

La méthylation selon BROWN (3) est spécifique de la fonction phénolique. Ce dérivé, particulièrement stable, rend les estrogènes insolubles en milieu alcalin, ce qui permet de les extraire des milieux aqueux par les solvants organiques. Cette propriété a été utilisée par BROWN (3) comme étape de purification des estrogènes urinaires.

L'acétylation touchant les hydroxyles phénoliques et alcooliques modifie d'une façon importante le poids moléculaire et la polarité des stéroïdes alcooliques. De plus, par hydrolyse, il est facile de régénérer quantitativement le stéroïde de base.
Pour répondre aux exigences de la chromatographie gazeuse avec détection par capture d'électrons, nous avons également préparé quelques dérivés halogénés.

- la synthèse d'un antigène permettant la formation d'un immunsérum spécifique de l'estradiol. Cet antigène a été obtenu en couplant l'estradiol à l'albumine bovine par l'intermédiaire de sa position 6. Avec S. de LAUZON, nous avons préparé, d'une façon analogue, un antigène obtenu en partant de l'estriol.

- l'étude des immunsérums obtenus après injection de ces antigènes à des animaux sur le plan activité, spécificité et sensibilité. Une étude comparative des antisérums obtenus a été effectuée.

- l'application de la méthode radio-immunologique au dosage des trois principaux estrogènes non conjugués de l'urine. Cette étude a été faite chez des femmes au cours du cycle, de la grossesse et dans différents cas pathologiques. Les résultats sont comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions pour les estrogènes libres plasmatiques.

Chronologiquement, ce travail comporte les parties suivantes :

PREMIERE PARTIE

Chapitre I - NOMENCLATURE - SYNTHESE - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

I) INTRODUCTION et NOMENCLATURE
II) Synthèse de stéroïdes phénoliques de référence
III) Spectres de fluorescence des estrogènes

Chapitre II - ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES ESTROGENES ET DE LEURS DERIVES ETHER-OXYDES OU ESTERS.

INTRODUCTION
I) Chromatographie sur papier
II) Chromatographie en couche mince
III) Chromatographie en phase gazeuse

DEUXIEME PARTIE

Chapitre I - RADIO-IMMUNOLOGIE

INTRODUCTION
I) Synthèse d'antigènes stéroïdiques
II) Préparation d'immunsérums
III) Etude comparative des immunsérums

Chapitre II - APPLICATION BIOLOGIQUE

Dosage des estrogènes libres urinaires ou plasmatiques chez la femme.

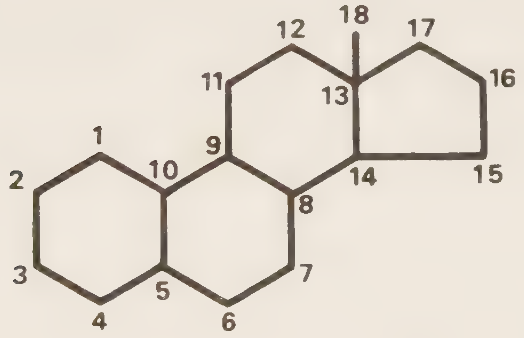
CHAPITRE I

NOMENCLATURE - SYNTHESE DE STEROIDES PHENOLIQUES, DE DERIVES ETHER-OXYDES ET ESTERS - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE CES COMPOSES

I) - INTRODUCTION ET NOMENCLATURE

Structure de l'estrane et de ses dérivés

L'estrane est un hydrocarbure à 18 atomes de carbone. Il est constitué par l'union de trois noyaux cyclohexaniques A, B, C et d'un noyau cyclopentanique D. Il possède un seul groupe méthyl fixé sur le carbone 13. La numérotation des atomes de carbone est celle des stéroïdes.



Les estrogènes naturels dérivés de l'estrane ont un cycle A aromatique et un hydroxyle phénolique en position 3. Le cycle A étant aromatique est plan et la jonction des cycles B/C et C/D est trans.

Sur le tableau I les stéroïdes phénoliques sont désignés par la nomenclature qui est la plus couramment employée dans la littérature internationale.

NOMENCLATURE SYSTEMATIQUE	NOM VULGAIRE	ABREVIATION
3-hydroxy estra-1,3,5 (10)-triène	17-désoxo-estrone	E_1-17-désoxo
3-hydroxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	estrone	E_1
3-hydroxy 16-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	estrone-16	E_1-16
3,17β-dihydroxy estra-1,3,5 (10)-triène	estradiol-17β	E_2-17β
3,17α-dihydroxy estra-1,3,5 (10)-triène	estradiol-17α	E_2-17α
3,16β-dihydroxy estra-1,3,5 (10)-triène	estradiol-16β	E_2-16β
3,16α-dihydroxy estra-1,3,5 (10)-triène	estradiol-16α	E_2-16α
3,16α-dihydroxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	16α-hydroxy-estrone	16α-OH-E_1
3,16β-dihydroxy 17-oxo estra 1,3,5 (10)-triène	16β-hydroxy-estrone	16β-OH-E_1
3,17β-dihydroxy 16-oxo estra 1,3,5 (10)-triène	16-céto-estradiol	16-céto-E_2
3,17β-dihydroxy 6-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	6-céto-estradiol	6-céto-E_2
3-hydroxy 16,17-dioxo estra-1,3,5 (10)-triène	16-céto-estrone	16-céto-E_1
3,16α,17β-trihydroxy estra 1,3,5-(10)-triène	estriol	E_3-αβ
3,16β,17β-trihydroxy estra-1,3,5 (10)-triène	16-épi-estriol	E_3-ββ
3,16α,17α-trihydroxy estra-1,3,5 (10)-triène	17-épi-estriol	E_3-αα
3,16β,17α-trihydroxy estra-1,3,5 (10)-triène	16,17-épi-estriol	E_3-βα
3,16α,17β-trihydroxy 6-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	6-céto-estriol	E_3-αβ-6-céto
3-acétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate de 17-désoxo-estrone	E_1-17-désoxo-acét.
3-acétoxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estrone	E_1-acét.
3-acétoxy 16-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estrone-16	E_1-16-acét.
3,17β-diacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estradiol-17-β	E_2-17 -acét.
3,17α-diacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estradiol-17α	E_2-17 -acét.
3,16β-diacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estradiol-16β	E_2-16 -acét.
3,16α-diacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estradiol-16α	E_2-16 -acét.

NOMENCLATURE SYSTEMATIQUE	NOM VULGAIRE	ABREVIATION
3,16α-diacétoxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	acétate de 16α-hydroxy-estrone	16α-OH-E_1-acét.
3,16β-diacétoxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	acétate de 16β-hydroxy-estrone	16β-OH-E_1-acét.
3,17β-diacétoxy 16-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	acétate du 16-céto-estradiol	16-céto-E_2-acét.
3-acétoxy 16-17-dioxo estra-1,3,5 (10)-triène	acétate du 16-céto-estrone	16-céto-E_1-acét.
3,16α,17β-triacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estriol	E_3-αβ-acét.
3,16β,17β-triacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate de 16-épi-estriol	E_3-ββ-acét.
3,16α,17α-triacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate de 17-épi-estriol	E_3-αα-acét.
3,16β,17α-triacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate de 16,17-épi-estriol	E_3-βα-acét.
3-méthoxy estra-1,3,5 (10)-triène	17-désoxo-estrone-3-méthyl éther	E_1-17-désoxo-3 mé.
3-méthoxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	estrone-3-méthyl éther	E_1-3-mé.
3-méthoxy 16-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	estrone-16-3-méthyl éther	E_1-16-3-mé.
17β-hydroxy 3-méthoxy estra-1,3,5 (10)-triène	estradiol-3-méthyl éther	E_2-17β-3-mé.
17α-hydroxy 3-méthoxy estra-1,3,5 (10)-triène	estradiol-17α-3-méthyl éther	E_2-17α-3-mé.
16β-hydroxy 3-méthoxy estra-1,3,5 (10)-triène	estradiol-16β-3-méthyl éther	E_2-16β-3-mé.
16α-hydroxy 3-méthoxy estra-1,3,5 (10)-triène	estradiol-16α-3-méthyl éther	E_2-16α-3-mé.
16α-hydroxy 3-méthoxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	16α-hydroxy-estrone-3-méthyl éther	16α-OH-E_1-3-mé.
16β-hydroxy 3-méthoxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	16β-hydroxy-estrone-3-méthyl éther	16β-OH-E_1-3-mé.
17β- hydroxy 3-méthoxy 16-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	16-céto-estradiol-3-méthyl éther	16-céto-E_3-3-mé.
3-méthoxy 16-17-dioxo estra-1,3,5 (10)-triène	16-céto-estrone-3-méthyl éther	16-céto-E_1-3-mé.
16α,17β-dihydroxy 3-méthoxy estra-1,3,5 (10)-triène	estriol-3-méthyl éther	E_3-αβ-3 -mé.
16β,17β-dihydroxy 3-méthoxy estra 1,3,5 (10)-triène	16-épi-estriol-3-méthyl éther	E_3-ββ-3-mé.
16α,17α-dihydroxy 3-méthoxy estra-1,3,5 (10)-triène	17-épi-estriol-3-méthyl éther	E_3-αα-3-mé.
16β,17α-dihydroxy 3-méthoxy estra-1,3,5 (10)-triène	16,17-épi-estriol-3-méthyl éther	E_3-βα-3-mé.

NOMENCLATURE SYSTEMATIQUE	NOM VULGAIRE	ABREVIATION
3-méthoxy 17β-acétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estradiol 3-méthyl éther	E_2-17β-acét. 3 -mé.
3-méthoxy 17α-acétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estradiol-17α 3-méthyl éther	E_2-17α-acét. 3-mé.
3-méthoxy 16β-acétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estradiol-16β 3-méthyl éther	E_2-16β-acét. 3-mé.
3-méthoxy 16α-acétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estradiol-16α 3-méthyl éther	E_2-16α-acét. 3-mé.
3-méthoxy 16α-acétoxy 17 oxo estra-1,3,5 (10)-triène	acétate de 16α-hydroxy-estrone 3 méthyl éther	E_1-16α -OH-acét. 3-mé.
3-méthoxy 16β-acétoxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	acétate de 16β-hydroxy-estrone 3-méthyl éther	E_1-16 β -OH-acét. 3-mé.
3-méthoxy 17β-acétoxy 16-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	acétate du 16-céto-estradiol 3-méthyl éther	E_2-16-céto-acét.3-mé.
3-méthoxy 16α,17β-diacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate d'estriol 3-méthyl éther	E_3-αβ-acét. 3-mé.
3-méthoxy 16β,17β-diacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate du 16-épi-estriol 3-méthyl éther	E_3-ββ-acét. 3-mé.
3-méthoxy 16α,17α-diacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate du 17-épi-estriol 3-méthyl éther	E_3-αα-acét. 3-mé.
3-méthoxy 16β,17α-diacétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	acétate du 16,17-épi-estriol 3-méthyl éther	E_3-βα-acét. 3-mé.

NOMENCLATURE SYSTEMATIQUE	NOM VULGAIRE	ABREVIATION
onochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate de 17-désoxo-estrone	E_1-17-désoxo-chloracét.
onochloracétoxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate d'estrone	E_1-chloracét.
7β-di-monochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate d'estradiol	E_2-17β-chloroacét.
6α,17β-tri-monochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate d'estriol	E_3-αβ-chloracét.
6β,17β-tri-monochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate de 16-épi-estriol	E_3-ββ-chloracét.
éthoxy-17β-monochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate d'estradiol 3-méthyl éther	E_2-17β-chloracét. 3-mé.
éthoxy-17α-monochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate d'estradiol 17α,3-méthyl éther	E_2-17α-chloracét. 3-mé.
éthoxy-16α-monochloracétoxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate de 16α-hydroxy-estrone 3-méthyl éther	16α-chloracét. 3-mé.
éthoxy-17β-monochloracétoxy 16-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate de 16-céto-estradiol 3-méthyl éther	16-céto-E_2-chloracét. 3-mé.
éthoxy-16α,17β-di-monochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate d'estriol 3-méthyl éther	E_3-αβ-chloracét. 3-mé.
éthoxy-16β,17β-di-monochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate de 16-épi-estriol 3-méthyl éther	E_3-ββ-chloracét. 3-mé.
éthoxy-16α,17α-di-monochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate de 17-épi-estriol 3-méthyl éther	E_3-αα-chloracét. 3-mé.
éthoxy-16β,17α-di-monochloracétoxy estra-1,3,5 (10)-triène	monochloracétate de 16,17-épi-estriol 3-méthyl éther	E_3-βα-chloracét. 3 mé.
ydroxy 17-pentafluorophénylhydrazono estra-1,3,5 (10)-triène	estrone-penta fluorophénylhydrazone	E_1-P.F.P.H.
ydroxy 16-pentafluorophénylhydrazono estra-1,3,5 (10)-triène	estrone-16-pentafluorophénylhydrazone	E_1-16 P.F.P.H.
éthoxy 17-pentafluorophénylhydrazono estra-1,3,5 (10)-triène	estrone-17-pentafluorophénylhydrazone 3-méthyl éther	E_1P.F.P.H. 3-mé.
éthoxy 16-pentafluorophénylhydrazono estra-1,3,5 (10)-triène	estrone-16-pentafluorophénylhydrazone 3-méthyl éther	E_1-16 P.F.P.H. 3-mé.
entadecafluorooctanoyloxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	perfluorooctanoate d'estrone	E_1-P.F.O.
7β-di-pentadecafluorooctanoyloxy estra-1,3,5 (10)-triène	perfluorooctanoate de l'estradiol	E_2-17β-P.F.O.
7α-di-pentadecafluorooctanoyloxy estra-1,3,5 (10)-triène	perfluorooctanoate du 17α-estradiol	E_2-17α-P.F.O.
6α-di-pentadecafluorooctanoyloxy 17-oxo estra-1,3,5 (10)-triène	perfluorooctanoate de la 16α-hydroxyestrone	E_2-16αOH-P.F.O.
6α,17β-tri-pentadecafluorooctanoyloxy estra-1,3,5 (10)-triène	perfluorooctanoate de l'estriol	E_3-αβ-P.F.O.
6β,17β-tri-pentadecafluorooctanoyloxy estra-1,3,5 (10)-triène	perfluorooctanoate du 16-épi-estriol	E_3-ββ-P.F.O.
6α,17α-tri-pentadecafluorooctanoyloxy estra-1,3,5 (10)-triène	perfluorooctanoate du 17-épi-estriol	E_3-αα-P.F.O.
6β,17α-tri-pentadecafluorooctanoyloxy estra-1,3,5 (10)-triène	perfluorooctanoate du 16,17-épi-estriol	E_3-βα-P.F.O.

II) - SYNTHESE DE STEROIDES PHENOLIQUES DE REFERENCE

Nous avons effectué la synthèse de tous les estrogènes utilisés dans ce travail à partir de l'estrone et de l'estradiol-17α*, selon des techniques déjà établies auxquelles nous avons apporté quelques modifications.

Des méthodes désormais classiques ont été proposées pour la synthèse de l'estriol et de la 16α-hydroxy-estrone par l'intermédiaire de l'époxyde 16-17 de l'estradiol (4); du 16-céto-estradiol (5) et du 16-épi-estriol (6-7) par oxydation de l'acétate d'énol de l'estrone avec le tétracétate de plomb. Nous préférons cependant utiliser l'action du méthylate de sodium sur la 16α-bromo-estrone. Cette attaque par un réactif nucléophile conduit au 3,16α-dihydroxy-estra-1,3,5(10)-triène-17-diméthoxy selon un processus décrit par MUELLER et al. (8) La 16α-hydroxy-estrone est obtenue par hydrolyse acide de ce composé. Les deux 16-hydroxy-estrone épimères ne sont pas stables en milieu alcalin et se réarrangent en 16-céto-estradiol. La réduction des fonctions cétoniques en 16 ou 17 des stéroïdes phénoliques par le borohydrure de potassium conduit à un alcool dont l'hydroxyle est en position β. Nous obtenons ainsi à partir de la 16α-hydroxy-estrone, le 16-céto-estradiol, l'estriol et le 16-épi-estriol. Ce procédé présente l'avantage de comporter des opérations simples et rapides ne nécessitant pas de purifications intermédiaires. Les rendements obtenus pour l'estriol et la 16α-hydroxy-estrone sont supérieurs à ceux décrits précédemment.

"L'estrone 16" est préparée par saponification du 16-épi-estriol ditosylate-3,16β obtenu par réduction du 16-céto-estradiol-ditosylate suivant la description de HUFFMAN et al (9). L'estrone-16

---

* Ces deux produits sont fournis par Roussel UCLAF

réduite par le borohydrure de potassium fournit l'estradiol-16β, l'inversion de l'hydroxyle en 16 se faisant par l'intermédiaire du tosylate permet d'obtenir l'estradiol-16α.

La 16α-bromo-estrone, après réduction de la fonction cétone, traitée par la potasse alcoolique fournit le 16β,17β-époxy-estra-1,3,5 (10)triène-3-ol. L'estriol-16β-17α est obtenu par reflux de l'époxyde dans l'acide acétique. Cette méthode a été décrite par FISHMAN et BIGGERSTAFF [10].

La synthèse de l'estriol-16α,17α a été décrite par PRELOG et al.[11]. Le dibenzoate du 17α-estradiol, soumis à une pyrolyse, fournit l'estra-1,3,5(10)16-tétraène-3-ol benzoate qui, après traitement avec l'acide osmique, conduit au 17-épi-estriol.

La 16β-hydroxy-estrone est obtenue par oxydation de l'acétate d'énol de l'estrone avec le tétracétate de plomb. La réduction de la fonction cétone fournit le 16-épi-estriol. Cette préparation a été décrite par BIFFERSTAFF et GALLAGHER [6].

La 16-céto-estrone est synthétisée à partir du benzoate d'estrone par l'intermédiaire du dérivé 16-oximino suivant la technique décrite par HUFFMAN et LOTT [5].

Nous avons utilisé la méthode de HUANG MINLON pour éliminer la fonction cétonique de l'estrone et obtenir la 17-desoxo-estrone.

Les dérivés acétylés sont obtenus en traitant les stéroīdes correspondants par l'anhydride acétique en présence de pyridine.

Les dérivés 3-méthyl éthers ont été préparés par action du sulfate de méthyle en milieu sodique non tamponné.

Les dérivés monochloracétylés ont été synthétisés selon une technique décrite par LANDOWNE et LIPSKY [12] en utilisant l'anhydride monochloracétique comme réactif. Seuls les dérivés monochloracétylés de l'estrone, de l'estradiol et de l'estradiol-3-méthyl-éther avaient

déjà été synthétisés et étudiés par VAN DER MOLEN et al.[13]. Ce travail, ainsi que la préparation des dérivés pentafluoro-phényl-hydrazones, a été réalisé en collaboration avec A. RADO [14].

Les dérivés pentafluorophénylhydrazones des estrogènes cétoniques ont été préparés selon une méthode voisine de celle décrite par ATTAL et al [15] pour la pentafluorophénylhydrazone de l'estrone-3-méthyl-éther.

Le mono et le diperfluorooctanoate de l'estradiol-17β ont été décrits par KIRSCHNER et TAYLOR [16]. L'ester de l'estrone le fut par EXLEY et DUTTON [17] en 1969. Ces auteurs ont obtenu ces dérivés en faisant réagir soit le chlorure soit l'anhydride de l'acide perfluorooctanoique avec le stéroīde en présence de pyridine. La réaction se fait en solution benzénique. Les caractéristiques physico-chimiques de ces composés n'ont pas été décrites. En utilisant le chlorure de l'acide perfluorooctanoique, nous avons synthétisé ces composés et en outre les dérivés de l'estradiol-17α, de la 16α-hydroxyestrone et des quatre estriols épimères. Contrairement aux stéroīdes de base, ces composés sont très solubles dans l'hexane, ce qui permet de les séparer du stéroīde n'ayant pas réagi. Ces stéroīdes sont stables en solution dans les solvants tels que le benzène ou l'hexane mais s'hydrolysent plus ou moins rapidement en présence d'alcool ou d'acétone. La stabilité sur plaque de gel de silice est également médiocre.

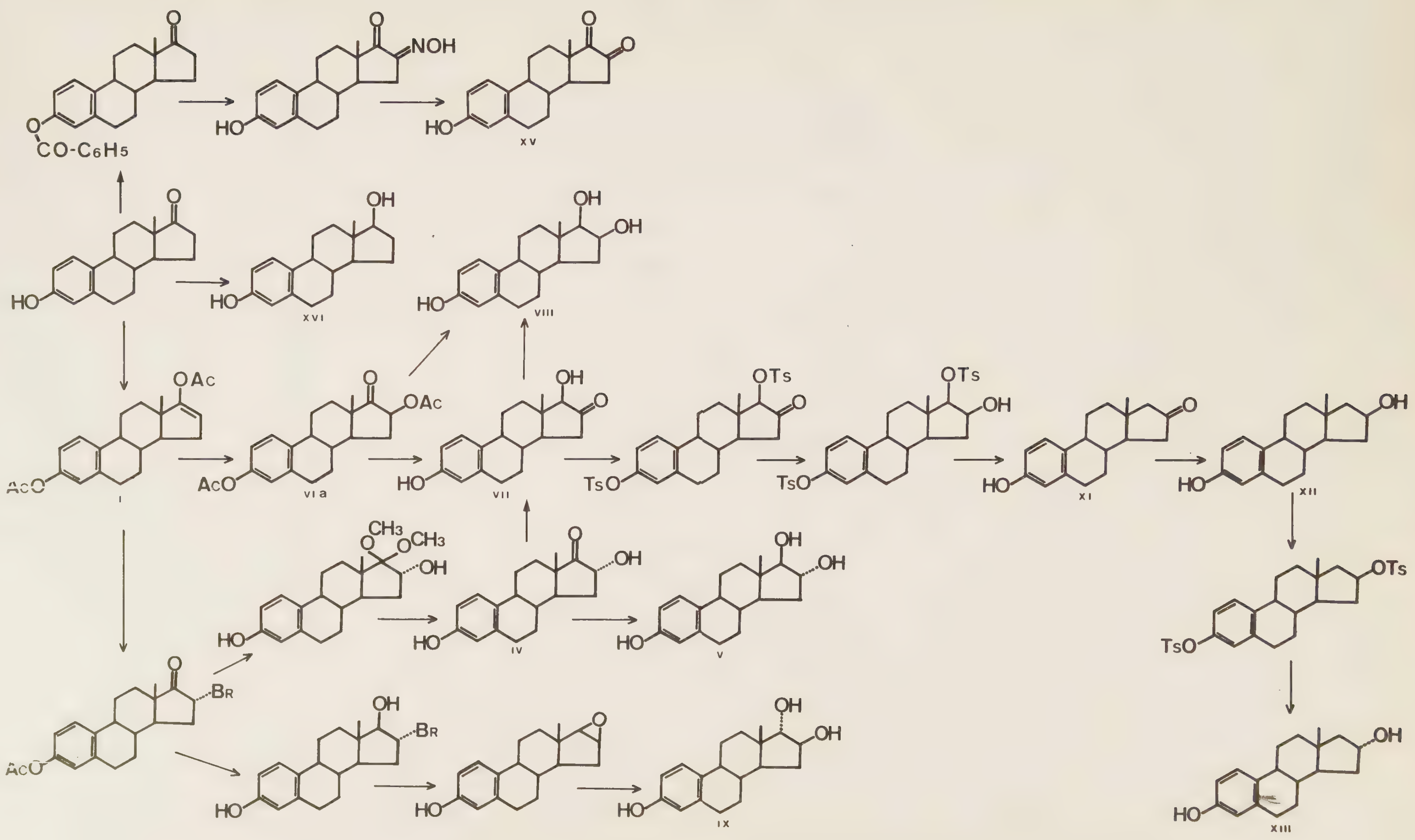


Fig.1 Synthèse de stéroides phénoliques

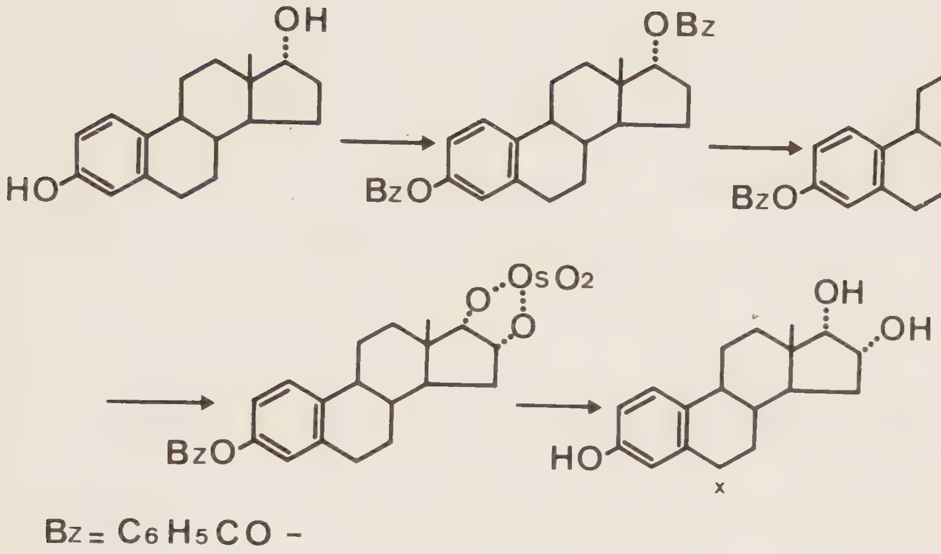


Figure 1 bis - Synthèse de stéroides phénoliques.

PARTIE EXPERIMENTALE

Acétate d'énol de l'estrone

32 g d'estrone sont traités par l'acétate d'isopropényl en présence d'acide sulfurique selon la méthode décrite par LEEDS et al [4]. Le passage sur colonne d'alumine est remplacé par un lavage de l'extrait brut sec dans 150 ml d'alcool méthylique; après filtration, le produit cristallin est dissous dans 100 ml de chloroforme, le solvant concentré, et le produit traité à nouveau par 150 ml de méthanol, filtré et séché. 30,7 g de cristaux blancs (F = 146-148° *) sont obtenus. Le rendement à partir de l'estrone est de 73 %.

Acétate d'énol de l'estrone-3-méthyl-éther (I)bis

10 g de 3-méthyl-éther de l'estrone sont traités selon LEEDS et al [4] pour fournir 9,6 g de cristaux F = 110-113°. Le rendement obtenu est de 83 %.

16α-bromo-estrone-acétate (II)

Pour cette opération nous utilisons la technique décrite par JOHNSON et JOHNS [18]. En partant de 30 g d'acétate d'énol de l'estrone, nous obtenons 28,8 g de produit F = 160-167° que l'on utilise tel quel pour les opérations suivantes. Le rendement est de 87 %. En vue de l'analyse on recristallise plusieurs fois dans l'éthanol pour obtenir un produit blanc F = 169-173°. $(\alpha)_D$ + 117°5 dans le chloroforme.

---

* Les points de fusion ont été mesurés avec l'appareil Kofler (Reichert). Ils ne sont pas corrigés.

Les pouvoirs rotatoires sont mesurés par le polarimètre Zeiss au 1/100ème de degré à 589 mμ

Analyse :

$C_{20}H_{23}O_3Br$ (391,3)	Calculé % C	61,38	H 5,92	Br 20,42
	Trouvé % C	61,61	H 5,85	Br 21,43

16α-bromo-estrone-acétate 3-méthyl-éther (II)^{bis}

Nous préparons ce dérivé selon une méthode par A. MARQUET et al [19]. A une molécule gramme d'acétate énol de l'estrone-3-méthyl-éther dissout dans le tétrahydrofuranne, on ajoute une molécule gramme de tribromure de phényltriméthyl-ammonium (P.T.T.). Après 1/4 d'heure à la température ambiante, on évapore le tétrahydrofuranne, on dilue avec de l'eau, et on neutralise avec du bicarbonate de soude. On extrait ensuite par du chloroforme, on lave à l'eau puis on sèche sur sulfate de soude et on concentre. En partant de 4,13 g d'acétate (I)^{bis}, on obtient 3,25 g de dérivé bromé F = 170-175°. On peut faire la synthèse directement à partir du 3-méthyl-éther de l'estrone mais le rendement est plus faible. Pour 2 g de 3-méthyl-éther de l'estrone, on obtient 850 mg du produit (II)^{bis} F = 165-175°.

3, 16α-dihydroxy-estra-1,3,5(10)triène-17-diméthoxy (III)

On dissout 28,5 g du dérivé bromé (II) F = 160-167° dans 500 ml de méthanol anhydre et on ajoute une solution méthanolique de méthylate de sodium (250 ml de méthanol + 10 g de sodium). Après une nuit à la température de la pièce, on concentre la solution sous vide à 35° et on acidifie par l'acide acétique à 20 % dans l'eau en agitant. On filtre le précipité obtenu et on lave à l'eau jusqu'à neutralité. On obtient 24 g de produit brut (rendement 100 %) qui est utilisé tel quel pour les opérations suivantes. En vue de

l'analyse élémentaire, on recristallise plusieurs fois dans le benzène et on obtient un produit F = 126-128°.

Analyse :

$C_{20}H_{28}O_4$ (332,42)	Calculé %	C 72,26	H 8,49	OCH_3	18,70
	Trouvé %	C 72,05	H 8,46	OCH_3	18,20

3-méthoxy-16α-hydroxy-estra-1,3,5(10)triène-17-diméthoxy (III)[bis]

On traite 2 g du dérivé bromé (II)[bis] comme ci-dessus et l'on obtient 1,46 g de produit F = 135-137° (rendement 77 %). Pour analyse on recristallise dans l'éthanol et on obtient un point de fusion de 137°.

Analyse :

$C_{21}H_{30}O_4$ (346,45)	Calculé %	C 72,80	H 8,73
	Trouvé %	C 72,60	H 8,59

3,16α-dihydroxy-estra-1,3,5(10)triène-17-one (IV)

On dissout 24 g du produit (III) brut dans 300 ml d'acétone et on ajoute 1500 ml de méthanol et 400 ml d'acide sulfurique 6 N. Après 48 heures à la température ambiante, on élimine les solvants organiques en concentrant sous vide à 30° après avoir ajouté 200 ml d'eau. On laisse 3 heures à la glacière, on filtre et on lave à l'eau jusqu'à neutralité. On obtient ainsi 20 g de 16α-hydroxy-estrone F = 215-230°.(Rendement 95 %).

Le rendement total à partir de l'estrone est de 60 %. On recristallise le produit pour analyse dans le méthanol et l'on obtient un produit F + 228-238°. $(\alpha)_D$ + 170 C = 0,64 dans l'éthanol.

Analyse :

$C_{18}H_{22}O_3$ (286,35)	Calculé %	C 75,49	H 7,75
	Trouvé %	C 75,29	H 7,70

3-méthoxy-16α-hydroxy-estra-1,3,5(10)triène-17-one $(IV)^{bis}$

2,68 g de 3-méthoxy-16α-hydroxy-estra-1,3,5(10)triène-17-diméthoxy $(III)^{bis}$ sont traités comme ci-dessus pour obtenir 2,3 g du produit $(IV)^{bis}$ F = 150-151°. Rendement 97 %. Le produit pour analyse est recristallisé dans l'éthanol et a un point de fusion de 159°. $(\alpha)_D$ + 166 C = 0,53 dans l'éthanol.

Analyse :

$C_{19}H_{24}O_3$ (300,38)	Calculé %	C 75,97	H 8,05
	Trouvé %	C 75,79	H 8,02

3,16α,17β-trihydroxy-estra-1,3,5(10)triène (V)

On dissout 20 g de 16α-hydroxy-estrone (IV) F = 215-230° dans 500 ml de méthanol et on ajoute lentement 20 g de borohydrure de potassium en refroidissant. Après une nuit, on neutralise par l'acide acétique, on concentre sous vide à 35°, on ajoute de l'eau, on filtre et on lave à l'eau. On obtient 18 g F = 268-274°. Rendement 97 %. Rendement de l'estrone 54 %.

On peut éliminer les traces d'estradiol contenues dans l'estriol de la façon suivante : après avoir dissout l'estriol dans le mélange méthanol-benzène 90-10, on dilue la solution par deux volumes de benzène. On concentre au 1/3 la solution pour éliminer une partie du méthanol et on ajoute à nouveau deux volumes de benzène. On concentre encore doucement la solution au 1/3; de cette façon l'estriol précipite très lentement sans entraîner l'estradiol qui reste en solution. Cette opération peut être effectuée deux fois si nécéssaire.

Pour analyse, on recristallise l'estriol dans le mélange méthanol-acétone et on obtient un point de fusion de 276-280°.

$(\alpha)_D$ + 36,4 c = 1 dans la pyridine.

Analyse :

$C_{18}H_{24}O_3$ (288,37) Calculé % C 74,97 H 8,38

Trouvé % C 74,76 H 8,53

3,16β-diacétoxy-estra-1,3,5(10)triène-17-one (VIa)

On prépare la 16β-hydroxy-estrone selon la technique de BIGGERSTAFF et GALLAGHER (6). Pour analyse, on recristallise le produit deux fois dans l'éthanol. On a alors un point de fusion de F = 144-146°. $(\alpha)_D$ + 130,4 dans l'éthanol.

Analyse :

$C_{22}H_{26}O_5$ (370,43) Calculé % C 71,33 H 7,07

Trouvé % C 71,18 H 7,05

3,16β-dihydroxy-estra-1,3,5(10)triène-17-one (VI)

150 mg du diacétate (VIa) sont dans 25 ml de méthanol additionnés de 4,5 ml d'acide sulfurique 6 N et laissés trois jours à la température ambiante. Après concentration au 1/3 du volume et 1 heure de séjour à 4° le précipité est filtré, lavé à l'eau et séché. Le point de fusion est de F = 213-216°. Après recristallisation dans l'éthanol, l'échantillon est obtenu F = 219-221°.
$(\alpha)_D$ + 173,7 dans l'éthanol.

Analyse :

$C_{18}H_{22}O_3$ (286,35) Calculé % C 75,49 H 7,75

Trouvé % C 75,29 H 7,70

3-méthoxy-16β-acétoxy-estra-1,3,5(10)triène-17-one

Le dérivé méthylé est préparé de la même façon que le dérivé libre en partant du méthyl-éther de l'acétate énol de l'estrone. 3 g de (I)^{bis} donnent après recristallisation du produit brut dans le méthanol, 900 mg de 3-méthyl-éther de la 16β-acétoxy-estrone

F = 142-148°. L'échantillon analytique recristallisé plusieurs fois dans le méthanol a un point de fusion de 156-157°.

Analyse :

$C_{21}H_{26}O_4$	(342,41)	Calculé %	C 73,66	H 7,65	OCH_3	9,06
		Trouvé %	C 73,49	H 7,66	OCH_3	9,40

3,17β-dihydroxy-estra-1,3,5(10)triène-16-one (VII)

5 g d'acétate énol de l'estrone (I) sont traités par le tétra-acétate de plomb comme ci-dessus (VI). Après extraction et lavage, le produit brut est mis en solution dans 250 ml de méthanol et traité par 50 ml d'une solution de carbonate de potassium (17,6 g dans 70 ml d'eau). Après 2 jours à la température ambiante, la solution est concentrée sous vide à 35° au 1/4, neutralisée par l'acide chlorhydrique, laissée 1 heure à la glacière et filtrée. Le précipité est lavé à l'eau jusqu'à neutralité. 2,7 g du produit VII F = 210-220° sont obtenus. Le rendement à partir de l'estrone est de 49 %. Pour l'analyse la recristallisation est effectuée dans le méthanol. $(\alpha)_D$ - 98,3 C = 0,88 dans l'éthanol.

Analyse :

$C_{18}H_{22}O_3$	(286,35)	Calculé %	C 75,49	H 7,75
		Trouvé %	C 75,47	H 7,68

Le 16-céto-estradiol peut être obtenu également par traitement alcalin de la 16α-hydroxy-estrone (IV). Le rendement total est du même ordre.

3,16β,17β-trihydroxy-estra-1,3,5(10)triène(16-épiestriol) (VIII)

La synthèse peut se faire soit à partir de l'acétate de 16β-hydroxy-estrone, soit à partir du 16-céto-estradiol.

Dans un ballon on dépose 30 g de produit de départ brut et 600 ml de méthanol. Après dissolution, on ajoute par petites fractions et en refroidissant le ballon, 30 g de borohydrure de potassium. Après une nuit à la température ambiante, on acidifie le mélange réactionnel par l'acide acétique, on concentre sous vide et on ajoute 400 ml d'eau. On filtre le précipité, on le lave à l'eau et on le cristallise dans l'éthanol. On obtient finalement 12,5 g de 16-épi-estriol F = 275-280°. Rendement à partir de l'estrone : 42 %.

Pour l'analyse on recristallise dans l'éthanol. Le point de fusion du produit est alors de 276-279°. $(\alpha)_D$ + 80 dans la pyridine.

Analyse :

$C_{18}H_{24}O_3$ (288,4)	Calculé %	C 74,97	H 8,39
	Trouvé %	C 75,39	H 8,39

Les traces d'estradiol présentes peuvent être éliminées en traitant 1g d'épi-estriol par 40 ml de benzène à ébullition, en filtrant et en recommençant cette opération 4 fois. On obtient ainsi 920 mg de produit très pur.

3,16β,17α-trihydroxy-estra-1,3,5(10)triène (IX)

L'estriol 16,17-épi est préparé selon la méthode décrite par FISHMAN et GALLAGHER [10].

a) Bromo hydrine-(16α-bromo-estradiol). Le borohydrure de potassium est utilisé pour préparer la bromhydrine à la place de l'hydrure de lithium et d'aluminium. 4,4 g de 16α-bromo-estrone (II) sont réduits par le borohydrure selon la méthode déjà décrite (V). On obtient 3,4 g de produit F = 110-120°. Le rendement est de 77 %.

b) Epoxyde - 3,4 g du produit précédent sont traités par la potasse méthanolique pour donner 1,86 g d'époxyde F = 183-190° avec un rendement de 79 %.

c) 16,17-épi-estriol - 1,8 g du produit ci-dessus donnent par traitement acétique 560 mg d'estriol-16β,17α F = 240-248°. Rendement 29 %. Le rendement calculé à partir de l'estrone est de 11 %.

L'échantillon pour analyse est recristallisé dans le mélange bénzène-hexane. Le point de fusion obtenu est de 248-249°.

Analyse :

$C_{18}H_{24}O_3$ (288,37)	Calculé %	C	74,97	H 8,38
	Trouvé %	C	74,67	H 8,46

3,16α,17α-trihydroxy-estra-1,3,5(10)triène (X)

Le 17-épi-estriol est préparé suivant la technique décrite par PRELOG et al [11]. Un produit de F = 242-243° est obtenu avec un rendement total à partir de l'estradiol-17α de 44 %.

L'échantillon analytique est recristallisé 2 fois dans l'éthanol. Son point de fusion est de 243-245°; $(\alpha)_D^{22}$ + 57 dans l'éthanol.

Analyse :

$C_{18}H_{24}O_3$ (288,37)	Calculé %	C	74,97	H 8,38
	Trouvé %	C	74,92	H 8,14

3-hydroxy-estra-1,3,5(10)triène-16-one (XI)

L'estrone 16 est préparée selon la méthode décrite par HUFFMAN et al [9]. Le produit obtenu est cristallisé 2 fois dans le méthanol. Son point de fusion est alors de 252-253°.

Analyse :

$C_{18}H_{22}O_2$ (270)	Calculé %	C	80	H 8,15
	Trouvé %	C	79,56	H 8,32

3,16β-dihydroxy-estra-1,3,5(10)triène (XII)

1 g d'estrone 16 (XI) est hydrogéné par le borohydrure de potassium comme précédemment. 634 mg de produit brut sont obtenus et recristallisés plusieurs fois dans le méthanol pour avoir 500 mg d'estradiol -16β F = 230-232°. Rendement 50 %. Le produit pour analyse a un point de fusion de 231-232°.

Analyse :

$C_{18}H_{24}O_2$	(272)	Calculé %	C 79,41	H 8,82
		Trouvé %	C 79,20	H 9,03

3,16α-dihydroxy-estra-1,3,5(10)triène (XIII)

380 mg d'estradiol-16β sont traités suivant la technique développée par HUFFMAN et LOTT [5]. 160 mg F = 220-226° sont obtenus. Le rendement est de 42 %. Pour analyse, le produit est recristallisé plusieurs fois dans le mélange méthanol-eau. Son point de fusion est de 223-228°.

Analyse :

$C_{18}H_{24}O_2$	(272)	Calculé %	C 79,41	H 8,82
		Trouvé %	C 79,44	H 8,79

3-hydroxy-estra-1,3,5(10)triène (XIV)

Pour 900 mg d'estrone, 1,3 g de soude, 2,2 g d'hydrate d'hydrazine à 98 % et 13 ml de diéthylène-glycol sont utilisés. Après 3 heures de reflux, la température est élevée progressivement à 195-200°, puis maintenue pendant 5 heures. Après refroidissement et extraction par le benzène, celui-ci est lavé à l'eau, déshydraté par du sulfate de soude. On obtient une colle marron qui est solubilisée dans le méthanol et filtrée sur de la norite. Après recristallisation dans le méthanol-eau, 600 mg du produit F = 134-136° sont obtenus.

L'échantillon analytique après plusieurs recristallisations dans la mélange méthanol-eau a un point de fusion de 136°.

$(\alpha)_D$ + 88 dans l'éthanol.

Analyse :

$C_{18}H_{24}O$	(256,37)	Calculé %	C 84,32	H 9,44
		Trouvé %	C 84,25	H 9,64

3-hydroxy-estra-1,3,5(10)triène-16,17-dione (XV)

- 16-oximino-estrone. Après avoir benzoylé l'estrone par le chlorure de benzoyle en milieu sodique, 4 g de benzoate sont obtenus puis traités suivant la technique utilisée par HUFFMAN et DARBY (7). 1,5 g de 16-oximino-estrone F = 208-212° est ainsi obtenu. (Rendement 47 %).

- 16-céto-estrone. 700 mg du produit ci-dessus sont traités selon HUFFMAN et LOTT (5). 400 mg de produit F = 238-240° sont obtenus. Rendement du benzoate d'estrone 28 %.

L'échantillon analytique est recristallisé dans le système benzène-hexane. Le point de fusion est alors de 236-242° (avec décomposition).

Analyse :

$C_{18}H_{20}O_3$	(284,34)	Calculé %	C 76,05	H 7,04
		Trouvé %	C 75,67	H 7,09.

Méthylation des hydroxyles phénoliques

a) - Pour 1 g de stéroïde

On dissout 1 g de stéroïde dans 20 ml de méthanol. Après addition de 70 ml de soude à 5 % et chauffage aux environs de 70°, on verse 6 ml de sulfate de méthyle, lentement, en agitant. L'agitation est maintenue 1 heure à 70°. On ajoute alors 25 ml de soude et à nouveau 6 ml de sulfate de méthyle. Après agitation d'une heure à 70°, le pH est contrôlé et on alcalinise si cela est nécessaire par de la soude à 5 %. Puis on laisse à nouveau 1/2 heure à 70°. On refroidit alors le mélange, on filtre le précipité et on le lave à l'eau jusqu'à neutralité. Après dessication, on recristallise le produit obtenu.

b) - Pour 1 mg de stéroïde

Pour des quantités de l'ordre du microgramme ou du milligramme, on utilise 1 ml de méthanol, 0,32 ml de soude à 5 % et 0,027 ml de sulfate de méthyle. On opère comme ci-dessus et on rajoute une deuxième fois 0,12 ml de soude et 0,05 ml de sulfate de méthyle. Après 1 heure à 70°, on ajoute 1 ml de soude à 5 %, on extrait 2 fois par 25 ml d'éther, on lave à l'eau distillée puis on sèche sur sulfate de soude et on évapore à sec sous vide à 30°. Les rendements obtenus sont de l'ordre de 90 à 100 %.

Acétylation des hydroxyles phénoliques et alcooliques

a) - Pour des quantités de stéroïdes supérieures à 100 mg, on utilise environ 15 fois le poids du stéroïde en pyridine et 30 fois son poids en anhydride acétique. Après une nuit à la température ambiante, on reprend par le benzène et on lave rapidement

avec de l'acide chlorhydrique N à 4°, avec de l'eau puis avec du bicarbonate de soude à 4°. On lave l'extrait benzénique à l'eau jusqu'à neutralité, on sèche sur sulfate de soude, on filtre, on évapore à sec sous vide à 35° puis on recristallise. Les rendements obtenus sont de l'ordre de 90 à 100 %.

b) - Pour des quantités inférieures à 100 mg, on utilise de 1 à 5 ml du mélange pyridine-anhydride acétique 1 : 5. Après une nuit à température ambiante ou 2 heures à 60° on évapore à sec. Le résidu est repris par 2 fois 2 ml de benzène et une fois 1 ml de méthanol en évaporant à sec chaque fois. Suivant les quantités, on utilise le produit, soit tel quel, soit recristallisé. Les rendements obtenus en produit recristallisé varient de 90 à 100 %.

Monochloracétylation des hydroxyles phénoliques et alcooliques

Ces dérivés ont été synthétisés par une modification de la technique de LANDOWNE et LIPSKY (12). A 100 mg de stéroïde dissous dans 5 ml de dioxane est ajouté un excès d'anhydride monochloracétique (FLUKA). La solution est refroidie et additionnée de 0,2 ml de pyridine. Le mélange est laissé une nuit à température ambiante, à l'obscurité, de préférence dans un dessicateur. On arrête la réaction par addition d'eau. L'extraction est réalisée par 2 fois 50 ml d'éther. Ce dernier est ensuite lavé par l'acide chlorhydrique puis par de l'eau. On enlève l'excès de réactif en lavant par une solution de bicarbonate de soude à 5 %. Après lavage aqueux jusqu'à neutralité, la solution est filtrée sur sulfate de soude et évaporée à sec. On recristallise dans le méthanol.

Les rendements de synthèse ont été dans l'ensemble de 80 %, à l'exception des monochloracétates d'estriols-3-méthyl-éther (65 %). Les résultats analytiques des monochloracétates synthétisés sont résumés sur le tableau II

Les pentafluoro-phényl-hydrazones

Les pentafluorophénylhydrazones des estrogènes cétoniques ont été synthétisés en dissolvant 100 mg de stéroïde dans 20 ml de méthanol. On ajoute à cette solution 10 ml d'un mélange 9/1 de méthanol-acide acétique contenant 200 mg de pentafluorophényl-hydrazine. La solution jaune intense est laissée pendant une nuit à la température ambiante. La réaction est stoppée par addition de 50 ml d'eau distillée et le mélange est extrait par l'hexane. Celui-ci est ensuite lavé par H_2SO_4 5 N puis 2 ou 3 fois par l'eau avant de filtrer sur sulfate de soude. Après évaporation à sec, on recristallise dans le méthanol (cristaux jaune brun).

Le rendement de synthèse est de l'ordre de 85 %.

Nous n'avons pas pu obtenir de dérivés pour les α-cétols.

Perfluorooctanoylation des hydroxyles phénoliques et alcooliques

a) - Pour des quantités voisines du milligramme

Dans un tube à fond rond on place le stéroïde et on ajoute 1 ml de benzène anhydre. 10 µl de chlorure de perfluorooctanoyle sont introduits dans la solution et après agitation, 10 µl de pyridine anhydre. Le mélange réactionnel est placé une heure à 70°. La solution est diluée par 10 ml de benzène et traitée par 10 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de soude à 2 %. Après agitation, décantation et élimination de la phase aqueuse, la fraction benzénique

est lavée par trois fois 10 ml d'eau distillée puis évaporée à sec sous azote à 60°.

Le rendement de la synthèse contrôlé par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme est supérieur à 90 %.

b) - Pour des quantités de l'ordre du nanogramme

Dans un tube rodé à fond pointu de 15 ml, on place le stéroïde et on ajoute 0,2 ml d'une solution de 0,01 ml de chlorure de perfluorooctanoyle dans 1 ml de benzène. Après agitation, on ajoute 2 µl de pyridine puis on laisse le mélange 1 heure à l'étuve à 60°.

Lorsque la réaction est terminée, on dilue la solution par 6 ml de benzène et on agite quelques instants avec 4 ml de solution de bicarbonate à 2 %. On soutire la solution aqueuse à la pipette Pasteur puis on lave la phase benzénique trois fois avec 4 ml d'eau distillée. On évapore alors à sec sous courant d'azote. Le tube est rincé par quelques gouttes de benzène pour entraîner le stéroïde dans le fond du tube. Puis on évapore de nouveau à sec.

TABLEAU II

PROPRIETES PHYSIQUES DES MONOCHLORACETATES D'ESTROGENES

Monochloracétates de :	Formule brute	Point de fusion		Analyse élémentaire % C	% H	% Cl	Pouvoir rotatoire (solvant)	$(\alpha)_D^{25}$
Estrone	$C_{20}H_{23}O_3Cl$	165°-166°	calc. tr.	69,25 69,11	6,68 6,71	10,22 10,28	Pyridine Chloroforme	+ 117° + 154°
17-désoxo-estrone	$C_{20}H_{25}O_2Cl$	125°-126°	calc. tr.	72,16 72,00	7,57 7,44	10,65 10,39	Pyridine Chloroforme	+ 65° + 49°5
estradiol-17β	$C_{20}H_{26}O_4Cl_2$	132°-134°	calc. tr.	62,12 61,95	6,16 6,18	16,67 16,91	Pyridine Chloroforme	+ 22° + 28°3
16-épi-estriol	$C_{24}H_{27}O_6Cl_3$	128°-130°	calc. tr.	55,65 55,81	5,26 5,30	20,55 19,97	Pyridine Chloroforme	+ 45°5 -
Estradiol-17α-3-Me-éther	$C_{21}H_{27}O_3Cl$	109°-111°	calc. tr.	69,50 69,42	7,50 7,40	9,77 9,65		
Estradiol-17β-3-Me-éther	$C_{21}H_{27}O_3Cl$	119°-120°	calc. tr.	69,50 69,40	7,50 7,48	9,77 9,51	Pyridine Chloroforme	+ 28°7 + 34°6
16-céto-estradiol-3-Me-éther	$C_{21}H_{25}O_4Cl$	140°-141°	calc. tr.	66,91 66,36	6,69 6,61	9,42 9,80	Pyridine Chloroforme	- 51°8 -
16α-OH-estrone-3-Me-éther	$C_{21}H_{25}O_4Cl$	104°-106°	calc. tr.	66,91 66,99	6,69 6,82	9,42 9,48	Pyridine Chloroforme	- + 131°
Estriol-3-Me-éther	$C_{23}H_{28}O_5Cl_2$	96°- 98°	calc. tr.	60,66 60,51	6,19 6,12	15,57 15,40	Pyridine Chloroforme	- 1°7 - 5°4
16-épi-estriol-3-Me-éther	$C_{23}H_{28}O_5Cl_2$	174°-176°	calc. tr.	60,66 60,82	6,19 6,28	15,57 15,46	Pyridine Chloroforme	+ 50° -
17-épi-estriol-3-Me-éther	$C_{23}H_{28}O_5Cl_2$	103°-105°		microsynthèse				
16,17-épi-estriol -3-Me-éther	un seul pic en chromatographie gazeuse			microsynthèse				

TABLEAU III

RESULTATS DE L'ANALYSE ELEMENTAIRE DES DERIVES METHYLES OU ACETYLES DES ESTROGENES

Dénomination	Formule brute	Analyse élémentaire	
		calculé %	trouvé %
17-désoxo-estrone 3-méthyl-éther	$C_{19}H_{26}O$	C = 84,44 H = 9,63	C = 83,97 H = 9,58
Acétate de 17-désoxo-estrone	$C_{20}H_{26}O_2$	C = 80,50 H = 8,78	C = 80,42 H = 8,96
Estrone-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{24}O_2$	C = 80,28 H = 8,45	C = 80,37 H = 8,50
Acétate d'estrone	$C_{20}H_{24}O_3$	C = 76,92 H = 7,69	C = 76,70 H = 7,71
Estrone-16-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{24}O_2$	C = 80,28 H = 8,45 OCH_3 = 10,91	C = 80,13 H = 8,57 OCH_3 = 11,17
Acétate de l'estrone-16	$C_{20}H_{24}O_3$	C = 76,92 H = 7,69	C = 76,88 H = 8,02
Estradiol-17β-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{26}O_2$	C = 79,67 H = 9,15	C = 79,45 H = 9,13
Acétate d'estradiol-3-méthyl-éther	$C_{21}H_{28}O_3$	C = 76,79 H = 8,59	C = 76,81 H = 8,55
Acétate d'estradiol-17β	$C_{22}H_{28}O_4$	C = 74,15 H = 7,86	C = 74,23 H = 8,05
Estradiol-17α-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{26}O_2$	C = 79,67 H = 9,15 OCH_3 = 10,84	C = 79,71 H = 9,20 OCH_3 = 10,81
Acétate d'estradiol-17α-3-méthyl-éther	$C_{21}H_{28}O_3$	C = 76,79 H = 8,59	C = 76,55 H = 8,53
Acétate d'estradiol-17α	$C_{22}H_{28}O_4$	C = 74,15 H = 7,86	C = 74,28 H = 7,97
Estradiol-16β-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{26}O_2$	C = 79,67 H = 9,15 OCH_3 = 10,84	C = 79,24 H = 9,06 OCH_3 = 10,56
Acétate d'estradiol-16β-3-méthyl-éther	$C_{21}H_{28}O_3$	C = 76,79 H = 8,59	C = 76,59 H = 8,80
Acétate d'estradiol-16β	$C_{22}H_{28}O_4$	C = 74,15 H = 7,86	C = 74,58 H = 7,79

TABLEAU III (suite)

Dénomination	Formule brute	Analyse élémentaire	
		calculé %	trouvé %
16α-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{24}O_3$	C = 75,79 H = 8,05	C = 75,79 H = 8,02
Acétate de 16α-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	$C_{21}H_{26}O_4$	C = 73,66 H = 7,65	C = 73,81 H = 7,50
Acétate de 16α-hydroxy-estrone	$C_{22}H_{26}O_5$	C = 71,33 H = 7,07	C = 71,43 H = 7,34
Acétate de 16β-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	$C_{21}H_{26}O_4$	C = 73,66 H = 7,65 OCH_3 = 9,06	C = 73,49 H = 7,66 OCH_3 = 9,40
Acétate de 16β-hydroxy-estrone	$C_{22}H_{26}O_5$	C = 71,33 H = 7,07	C = 70,99 H = 7,30
16-céto-estradiol-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{24}O_3$	C = 75,97 H = 8,05 OCH_3 = 10,32	C = 76,06 H = 8,35 OCH_3 = 10,32
Acétate de 16-céto-estradiol	$C_{22}H_{26}O_5$	C = 71,33 H = 7,07	C = 71,11 H = 7,05
Acétate d'estriol-3-méthyl-éther	$C_{23}H_{30}O_5$	C = 71,46 H = 7,82	C = 71,50 H = 7,81
Acétate d'estriol	$C_{24}H_{30}O_6$	C = 69,54 H = 7,30	C = 69,30 H = 7,10
16-épi-estriol-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{26}O_3$	C = 75,46 H = 8,67	C = 75,29 H = 8,60
Acétate de 16-épi-estriol-3-méthyl-éther	$C_{23}H_{30}O_5$	C = 71,46 H = 7,82	C = 71,36 H = 7,96
Acétate de 16-épi-estriol-3-méthyl-éther	$C_{24}H_{30}O_6$	C = 69,54 H = 7,30	C = 69,76 H = 7,28
17-épi-estriol-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{26}O_3$	C = 75,46 H = 8,67 OCH_3 = 10,25	C = 75,84 H = 8,81 OCH_3 = 9,87

TABLEAU III (suite)

Dénomination	Formule brute	Analyse élémentaire calculé %	Analyse élémentaire trouvé %
Acétate de 17-épi-estriol-3-méthyl-éther	$C_{23}H_{30}O_5$	C = 71,46 H = 7,82	C = 71,34 H = 7,94
Acétate de 17-épi-estriol-3-méthyl-éther	$C_{24}H_{30}O_6$	C = 69;54 H = 7,30	C = 69,84 H = 7,20
16,17-épi-estriol-3-méthyl-éther	$C_{19}H_{26}O_3$	C = 75,46 H = 8,67 OCH_3 = 10,25	C = 75,27 H = 8,48 OCH_3 = 10,28
Acétate de 16,17-épi-estriol-3-méthyl-éther	$C_{23}H_{30}O_5$	C = 71,46 H = 7,82	C = 71,25 H = 7,80
Acétate de 16,17-épi-estriol	$C_{24}H_{30}O_6$	C = 69,54 H = 7,30	C = 69,81 H = 7,26
Estrone-17-pentafluorophénylhydrazone-3-méthyl-éther	$C_{25}H_{25}O_1F_5N_2$	C = 63,69 H = 5,57 N = 6,19 F = 21,01	C = 64,40 H = 5,56 N = 6,07 F = 19,59
Perfluorooctanoate d'estrone	$C_{26}H_{21}O_3F_{15}$	C = 46,85 H = 3,17 F = 42,76	C = 46,80 H = 3,28 F = 40,88
Acétate d'estradiol-16 α	$C_{22}H_{28}O_4$	C = 74,15 H = 7,86	C = 74,67 H = 7,90

III) - SPECTRES DE FLUORESCENCE

Les phénolstéroïdes traités à chaud par un acide fort donnent naissance à des composés jaunes présentant une fluorescence caractéristique de la substance lorsqu'ils sont soumis à l'action d'un rayonnement lumineux de longueur d'onde bien définie.

Nous avons étudié d'une manière systématique les spectres d'excitation et de fluorescence des estrogènes synthétisés traités à chaud par des acides forts suivant plusieurs modalités. Nous donnons les longueurs d'onde des maxima des spectres pour chaque dérivé ainsi que les longueurs d'onde des maxima des spectres d'absorption et la valeur de l'absorbance pour chaque stéroïde après réaction d'Ittrich.

PARTIE EXPERIMENTALE

Pour cette étude systématique de la fluorescence des phénolstéroïdes, réalisée en collaboration avec S. de LAUZON, nous avons appliqué successivement trois réactions colorées :

- la réaction décrite par SCHOLLER, LONGCHAMPT et JAYLE en 1960, utilisant l'acide sulfurique 15 M.[20]

- la réaction de FINKELSTEIN (1952), utilisant l'acide phosphorique.[21]

- la réaction d'ITTRICH,[22] telle qu'il l'a décrite en 1960, le solvant organique utilisé pour l'extraction du composé coloré étant ici le chloroforme et non le tétrabromoéthane.

Nous décrivons brièvement ces trois méthodes :

Acide sulfurique 15 M

La réaction est pratiquée sur 0,5µg de chaque estrogène. Celui-ci est évaporé sous un courant d'azote puis additionné de 2 ml de H_2SO_4 15 M (BDH) et laissé dix minutes au bain-marie à ébullition. Après refroidissement, dix minutes dans un bain-marie glacé, on peut enregistrer les spectres des phénolstéroïdes ainsi traités.

Acide phosphorique 100 %

La réaction a été également pratiquée sur 0,5 µg de chaque estrogène comme ci-dessus. Le phénolstéroïde est évaporé sous un courant d'azote puis additionné de 3 ml d'acide orthophosphorique (BDH) à 100 %. Les tubes contenant le stéroïde sont laissés dans un bain-marie bouillant pendant 30 minutes puis dans l'eau glacée durant dix minutes et les spectres d'excitation et de fluorescence sont enregistrés.

Réaction d'Ittrich

La quantité de stéroïde utilisé dans cette réaction est de 10 µg pour l'étude des spectres d'absorption et de 0, 1 µg pour l'étude des spectres d'excitation et de fluorescence. Le stéroïde est additionné de 0,5 ml d'une solution éthanolique d'hydroquinone à 4 % puis évaporé sous un courant d'azote. On ajoute alors à l'extrait 0,4 ml d'eau bidistillée et 0,75 ml d'acide sulfurique 36 N (BDH analar) en opérant dans l'eau glacée. On fait bouillir 40 minutes au bain-marie en agitant les tubes deux ou trois fois puis on refroidit dans la glace et on ajoute 1,5 ml d'eau bi-

distillée en homogénéisant. On extrait alors la coloration par 2,5 ml d'une solution de p-nitrophénol à 2 % dans le chloroforme. On enregistre les différents spectres des phénolstéroïdes en solution dans cette phase organique ainsi séparée.

L'enregistrement des spectres d'absorption a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre CARY (modèle 15, M 50, série 3.000). Les spectres d'excitation et de fluorescence ont été enregistrés à l'aide d'un spectrofluorimètre Farrand équipé d'une lampe au xénon.

TABLEAU IV

SPECTRES D'EXCITATION ET DE FLUORESCENCE DES ESTROGENES DANS H_2SO_4 15 M.

ESTROGENES	Maximum Excitation nm	Maximum Fluorescence nm
Estrone	450	480
Estrone-3-méthyl-éther	460	480
Estrone-16	465	515
Estrone-16-3-méthyl-éther	470	510
Estradiol	450	480
Estradiol-3-méthyl-éther	460	485
Estradiol-17α	450	480
Estradiol-17α-3-méthyl-éther	465	490
Estradiol-16β	450	480
Estradiol-16β-3-méthyl-éther	470	490
16-céto-estrone	455	510
16-céto-estrone-3-méthyl-éther	470	520
16α-hydroxy-estrone	465	530
16α-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	465	545
16β-hydroxy-estrone	465	530
6-céto-estrone	400	450
6-céto-estradiol	400	450
16-céto-estradiol	465	530
16-céto-estradiol-3-méthyl-éther	465	530
Estriol-16α,17β	450	480
Estriol-16α,17β-3-méthyl-éther	460	480
Estriol-16β,17β	450	480
Estriol-16β,17α	450	480
Estriol-16β,17α-3-méthyl-éther	460	480
Estriol-16α,17α	450	470
Estriol-16α,17α-3-méthyl-éther	460	480

TABLEAU V

SPECTRES D'EXCITATION ET DE FLUORESCENCE DES ESTROGENES DANS H_3PO_4 100 %

ESTROGENES	Maximum Excitation nm	Maximum Fluorescence nm
Estrone-17-désoxo	465	490
Estrone	460	480
Estrone-3-méthyl-éther	465	500
Estrone-16	430	480
Estrone-16-3-méthyl-éther	470	530
Estradiol-17β	460	480
Estradiol-17β-3-méthyl-éther	465	500
Estradiol-17α	460	480
Estradiol-17α-3-méthyl-éther	465	490
Estradiol-16β	460	490
Estradiol-16β-3-méthyl-éther	470	490
Estradiol-16α	460	490
16-céto-estrone	470	510
16-céto-estrone-3-méthyl-éther	470	510
16α-hydroxy-estrone	465	530
16α-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	510(490,480, 465)	540
16β-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	465	520
16β-acétoxy-estrone-3-méthyl-éther	460	485
6-céto-estrone	420	470
6-céto-estradiol	420	470
16-céto-estradiol	465(480,490)	540
16-céto-estradiol-3-méthyl-éther	400	460
Estriol-16α,17β	460	490
Estriol-16α,17β-3-méthyl-éther	430	480
Estriol-16β,17β	460	490
Estriol-16β,17β-3-méthyl-éther	470	490
Estriol-16β,17α	460	485
Estriol-16β,17α-3-méthyl-éther	465	490
Estriol-16α,17α	460	485
Estriol-16α,17α-3-méthyl-éther	465	495

TABLEAU **VI**

SPECTRES D'ABSORPTION, D'EXCITATION ET DE FLUORESCENCE DES ESTROGENES APRES REACTION D'ITTRICH

ESTROGENES	Maximum Absorption nm	Absorbance	Maximum Excitation nm	Maximum Fluorescence nm
17-désoxo-estrone	—	—	—	—
Estrone	537	0,79	540	550
Estrone-3-méthyl-éther	537,5	0,60	540	550
Estrone-16	—	—	—	—
Estrone-16-3-méthyl-éther	—	—	470	—
Estradiol-17β	537,5	0,40	540	550
Estradiol-17β-3-méthyl-éther	537,5	0,41	540	550
Estradiol-17α	537,5	0,42	540	550
Estradiol-17α-3-méthyl-éther	537	0,33	540	550
Estradiol-16β	536,5	0,35	540	550
Estradiol-16β-3-méthyl-éther	538	0,27	540	550
Estradiol-16α	537	0,37	540	550
16-céto-estrone	—	—	540	550
16-céto-estrone-3-méthyl-éther	—	—	470	—
16α-hydroxy-estrone	537	0,61	540	550
16α-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	537,5	0,48	540	550
16β-hydroxy-estrone	537,5	0,71	540	550
16β-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	537,5	0,47		
6-céto-estrone	—	—	535	550
6-céto-estradiol	—	—	535	550
16-céto-estradiol	536,5	0,84	540	550
16-céto-estradiol-3-méthyl-éther	537,5	0,60	540	550
Estriol-16α,17β	537	0,69	540	550
Estriol-16α,17β-3-méthyl-éther	536,5	0,30	540	550
Estriol-16β,17β	537	0,33	540	550
Estriol-16β,17β-3-méthyl-éther	537	0,57	540	550
Estriol-16β,17α	537	0,51	540	550
Estriol-16β,17α-3-méthyl-éther	537	0,27	540(470,450)	550(510,430)
Estriol-16α,17α	537	0,64	540	550
Estriol-16α,17α-3-méthyl-éther	537	0,24	540	550

CHAPITRE II

ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES ESTROGENES ET DE LEURS DERIVES ETHER-OXYDES OU ESTERS

Ce chapitre a pour objet l'étude du comportement chromatographique des estrogènes oxygénés ou non en position 16 et 17 et de leurs dérivés éther-oxydes ou esters par :

I) - Chromatographie d'adsorption sur papier

II) - Chromatographie d'adsorption sur couche mince

III) - Chromatographie en phase gazeuse.

Cette étude permet de proposer quelques systèmes chromatographiques pour la purification, le fractionnement et l'identification de ces composés en vue d'une application biologique.

INTRODUCTION GENERALE

La chromatographie d'adsorption sur colonne a été découverte en 1903 par M. TSWETT [(23)]. Cependant ce sont les travaux de KUHN et LEDERER [(24)] qui ont donné à la chromatographie l'essor extraordinaire que nous lui connaissons aujourd'hui. On peut dire que la biochimie lui doit une partie importante des progrès qu'elle a accomplis au cours de ces dernières années.

La chromatographie a pour objet de séparer des substances initialement mélangées et de les caractériser par différentes valeurs (R_F, R_T, etc.). Elle permet en outre la mesure des fractions

isolées ainsi qu'une approche dans la détermination structurale de composés inconnus. C'est une méthode spécifique, universelle, sensible et souple.

Sur un plan très général, on distingue trois types de chromatographie en phase liquide : la chromatographie d'adsorption, la chromatographie de partage et la chromatographie par échange d'ions.

Plus récemment, deux autres types de chromatographie ont été introduits : la chromatographie par filtration sur gel et la chromatographie par affinité. Cette distinction exprime des propriétés différentes bien que l'exclusivité d'un mécanisme au cours d'une séparation chromatographique ne puisse jamais être assurée (à l'exception de la chromatographie par affinité).

Les bases de l'aspect théorique de la chromatographie de partage ont été établies par MARTIN et SYNGE en 1941 [(25)]. Les chromatographies d'adsorption et de partage peuvent se réaliser en phase liquide, sur colonne, sur papier, sur couche mince ou en phase vapeur sur colonne.

L'étude de la migration d'une substance dans un système chromatographique est faite par sa détection directement sur le support chromatographique (chromatographie sur couche mince ou sur papier)ou à la sortie de la colonne. Cette migration qui est, sous certaines conditions, caractéristique de la substance peut être définie dans le domaine de la chromatographie sur papier ou sur couche mince par différentes valeurs telles que :

$$R_F = \frac{\text{déplacement de la bande du corps dissout}}{\text{déplacement du front du liquide}}$$

$$R_T = \frac{\text{déplacement du corps étudié}}{\text{déplacement d'un composé témoin}}$$

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$$

Le R_T permet d'éliminer certaines erreurs dûes aux conditions opératoires.

Le R_M, introduit par BATE-SMITH et al [26] à la suite des théories de MARTIN [27] sur la chromatographie de partage favorise l'obtention d'informations sur la structure d'un composé donné. En effet, le R_M est proportionnel à l'énergie libre nécéssaire au transfert d'une molécule d'une phase à l'autre. Il est constitué des valeurs additives représentant les groupements de la molécule et d'une constante (dûe au système de solvant, support, etc.).

Dans le domaine des stéroïdes, le calcul de ΔR_M est délicate à cause de la stéréochimie, de la configuration, des interactions et associations du squelette et du substituant et des substituants entre eux.

Les aspects théoriques et pratiques de ces procédés ont fait l'objet de nombreuses publications. Ces études ont été rassemblées dans des revues générales (E. LEDERER et M. LEDERER [28], E. LEDERER [29], DEMOLE [30], STAHL [31], K. RANDERATH [32], etc.).

Des revues ont été faites dans le domaine des stéroïdes par BUSH [33], JAYLE [1], NEHER [34], etc.

L'application de la chromatographie à l'étude des estrogènes d'origine biologique est assez délicate. En effet ces composés ont des formes assez plates, des structures voisines les unes des autres, des polarités élevées et des stabilités moyennes. De plus, dans un même milieu biologique on a pu déceler un nombre important d'estrogènes dont les rapports quantitatifs peuvent être, dans l'extrait, de 1 à 100; on conçoit donc que les stéroïdes "en excès" puissent s'étaler sur une surface appréciable du chromatogramme et masquer ainsi un autre stéroïde. Il est donc important d'effectuer des purifications préalables et de disposer de systèmes chromatographiques variés. La formation de dérivés simples (éther-oxydes, esters) en modifiant la polarité des estrogènes élargit le champ d'application de la chromatographie.

I) - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La chromatographie sur papier a été pendant plusieurs années la méthode de choix pour l'étude des stéroïdes des milieux biologiques. Cette méthode permet de séparer, d'identifier et de doser des quantités de stéroïdes de l'ordre du microgramme. L'emploi de réactifs sélectifs pour la révélation de ces stéroïdes après migration affine les possibilités d'identification de ces corps.

De nombreux systèmes chromatographiques ont été proposés pour la séparation des stéroïdes. Parmi ceux-ci :

- les systèmes type ZAFFARONI (habituellement sans phase aqueuse) dans lesquels le papier est d'abord imprégné de la phase stationnaire avant d'effectuer le dépôt de la substance.

- les systèmes type BUSH. Le papier sec est chargé avec la substance puis mis dans une atmosphère contenant les deux phases. Le papier absorbe préférentiellement la phase polaire (aqueuse le plus souvent).

- les systèmes à phase inversée dans lesquels le papier est préalablement rendu hydrophobe.

- les systèmes anhydres de PASQUALINI et JAYLE (35) dans lesquels le papier joue le rôle d'adsorbant.

- les systèmes utilisant des solvants aqueux sur papier cellulose ou de fibres de verre imprégnés d'acide salicylique, de célite, etc.

Dans le domaine des estrogènes, un grand nombre de méthodes chromatographiques ont été proposées pour l'analyse de ces stéroïdes. Une revue des différents systèmes décrits pour la séparation des estrogènes est donnée par OAKEY (36).

S'il est relativement facile d'isoler des composés différant entre eux par la nature ou le nombre de leurs fonctions, il est par contre plus difficile de séparer les isomères. L'estradiol-17β et son isomère -17α ont été séparés par AXELROD (37) en utilisant l'orthodichlorobenzène et par ROSENKRANTZ (38) dans le système toluène-propylène glycol. OAKEY (39) a obtenu le même résultat en faisant migrer les stéroïdes dans le système éther de pétrole-méthanol aqueux pendant 41 heures.

Le comportement en chromatographie sur papier des isomères de l'estriol a été étudié par BREUER et al (40). Les deux isomères en cis peuvent être séparés entre eux ainsi que des isomères trans avec le système chloroforme-formamide en 6 heures. Des dérivés ont été synthétisés pour tenter d'améliorer la séparation; les stéroïdes ayant une fonction cis-glycol ont été transformés en acétonide et isolés par le système chloroforme-formamide. Le comportement chromatographique des α-cétols a été étudié par BREUER, KNUPPEN et PANGELS (41-42).

Le système chloroforme-formamide est un des meilleurs systèmes utilisés pour la séparation des estrogènes possèdant une fonction oxygénée en 16 ou 17 (39). Malheureusement la formamide est difficile à obtenir à l'état de haute pureté et la présence de traces de ce solvant même après séchage prolongé, gêne la détection des stéroïdes avec un certain nombre de réactifs. Les impuretés déposées sur le papier avec la formamide peuvent être éluées en même temps que les stéroïdes et gêner les analyses consécutives. D'autre part, la migration est lente (6 à 12 heures).

La séparation d'un grand nombre d'estrogènes a été décrite par KUSHINSKY et DEMETRIOU (43) dans le système benzène-heptane-méthanol-eau (70 : 30 : 80 : 20) v/v. La séparation totale des cétols et des estriols n'est cependant pas obtenue.

Des essais de chromatographie des estrogènes ont été effectués avec des papiers traités par du p-toluène sulfonate de sodium ou de l'alumine. HAMILTON et DIECKERT (44) ont séparé les deux estradiols sur papier à fibres de verre traité par le silicate de potassium dans le système isooctane-benzène. Dans ce système, l'estradiol-17β montre une mobilité plus grande que l'estradiol-17α.

Les éther-oxydes et les esters des estrogènes ont été relativement peu étudiés par chromatographie sur papier. Cependant, quelques méthodes ont été proposées. MARKWARDT (45) a utilisé un papier traité au silicone pour étudier le comportement de quelques esters de stéroïdes phénoliques. L'estrone, l'estradiol, l'estriol et le 16 épi-estriol ont été séparés après acétylation par KECSKES et al (46). Quelques 3-méthyl-éthers d'estrogènes ont été étudiés dans le système ligroïne-méthanol aqueux par SMITH (47). PIGON et al (48) ont séparé les deux isomères de l'estradiol-3-méthyl-éther dans le système skellysolve B-formamide.

Avec PASQUALINI et JAYLE (49), nous avons étudié la migration des dérivés acétylés de neuf estrogènes. En utilisant deux systèmes, l'un de chromatographie de partage avec décaline-propanediol et l'autre avec un papier non imprégné et l'heptane comme solvant, nous avons ainsi pu séparer entre eux les isomères α-cétoliques-16-17 et les quatre isomères de l'estriol.

La révélation des estrogènes après migration est une étape importante de la chromatographie sur papier. La méthode choisie doit être simple, reproductible et sensible. Certaines méthodes proposées sont spécifiques de telle ou telle fonction ou produisent des colorations variées avec les différents stéroïdes [50]. Parmi les méthodes les plus fréquemment employées, on peut citer celles utilisant le chlorure ferrique et le ferricyanure de potassium en solution aqueuse [51] ou le réactif de FOLIN et CIOCALTEU [52]; ce dernier est cependant moins spécifique des stéroïdes phénoliques. Ces méthodes permettent de détecter des quantités de stéroïdes de l'ordre de 1 à 5 microgrammes. La 2,7-dichlorofluorescéine en solution aqueuse (0,001 %) permet d'observer à la lampe à ultra-violets des quantités de stéroïdes de l'ordre du microgramme sans détruire celui-ci, ce qui permet après extraction d'effectuer d'autres analyses sur l'estrogène [53].

Les dérivés esters ou éther-oxydes sont en général plus difficiles à détecter et il est souvent nécessaire de procéder à une hydrolyse préalable. Pour les méthyl-éthers dont l'hydrolyse est délicate, LONGCHAMPT et JAYLE [54] utilisent l'acide sulfurique fumant à 15 % de SO_3. La sensibilité obtenue est de 2 µg/Cm2. La 2,7-dichlorofluorescéine permet également de détecter ces dérivés.

L'utilisation de la chromatographie sur papier pour le dosage des phénolstéroïdes en milieu biologique a fait l'objet de nombreuses publications. Les stéroïdes sont d'abord extraits des différents milieux biologiques par des solvants appropriés. La chromatographie sur papier est alors utilisée soit seule, soit conjointement à d'autres systèmes chromatographiques tels que la

chromatographie sur couche mince [55], la chromatographie sur colonne [56-57-58] ou la chromatographie en phase gazeuse [59]. Le dosage quantitatif peut se faire soit directement sur le chromatogramme [43-60], soit le plus souvent après élution. Le résidu est analysé par colorimétrie ou par fluorimétrie. Dans ce dernier cas, la réaction de fluorescence selon ITTRICH, plus spécifique, est recommandée [61].

Pour obtenir les meilleurs résultats par ces méthodes, il est nécessaire de disposer de procédés qui soient :

1) Efficaces, pour obtenir une bonne purification des substances à analyser;
2) Variés, pour procurer des résultats notablement différents afin d'obtenir une bonne identification des substances;
3) Sans risques d'introduire des impuretés pouvant gêner les analyses ultérieures, par exemple la fluorescence ou la chromatographie en phase gazeuse;
4) Reproductibles;
5) Rapides.

L'emploi d'un procédé satisfaisant à toutes ces exigences et cependant différent des systèmes classiques marque notre contribution personnelle à l'analyse chromatographique des estrogènes. Il s'agit de la chromatographie sur papier non imprégné de phase stationnaire. Avec ce procédé, nous avons étudié non seulement la migration de différents estrogènes mais aussi celle de leurs dérivés acétylés ou de leurs 3-méthyl-éthers.

Description expérimentale de nos travaux :

Ce chapitre comporte les divisions suivantes :

A) Chromatographie sur papier à fibres de cellulose

1) Papier non imprégné - Conditions particulières de la chromatographie.

2) Etude comparative de la chromatographie de partage et d'adsorption sur papier.

B) Chromatographie d'adsorption sur papier à fibres de verre (matériel, méthodes et systèmes de révélation utilisés, résultats).

C) Discussion, comparaison avec les autres systèmes décrits.

A) Chromatographie sur papier à fibres de cellulose

Partie expérimentale

- Purification des solvants utilisés

Décaline - La décaline (Prolabo) exempte de peroxyde est redistillée une fois.

Heptane - L'heptane pur (Prolabo) est agité avec de l'acide sulfurique concentré (100 ml par litre d'heptane). Après avoir décanté l'acide, l'opération est renouvelée 2 ou 3 fois; l'heptane est lavé ensuite avec de l'eau jusqu'à neutralité, séché sur chlorure de calcium, distillé sur potasse et conservé sur sodium.

Benzène - Le benzène (Prolabo) est traité par de l'acide sulfurique comme l'heptane, lavé une fois avec de l'eau, 2 fois avec de la potasse à 50 % puis lavé avec de l'eau jusqu'à neutralité, séché sur chlorure de calcium,

distillé deux fois, la première fois sur potasse.

Acétate d'éthyle - L'acétate d'éthyle (Prolabo) est lavé avec du bicarbonate de soude puis avec de l'eau jusqu'à neutralité. Il est séché sur chlorure de calcium puis distillé.

Propanediol - Le propanediol (Prolabo) est redistillé.

- Méthode

Sauf indication contraire, le papier utilisé est le papier Schleicher et Schull n° 2043 B, de 20 cm sur 48 cm, dont l'extrêmité inférieure est coupée en dents de scie.

Pour la chromatographie de partage, le papier est plongé dans un récipient contenant le mélange propanediol-méthanol 1/2 v/v. Le papier est ensuite essoré à l'aide de papier filtre.

Pour la chromatographie sur papier sec, trois lignes sont tracées respectivement à 3,5 cm, 4 cm, 5 cm et 5,5 cm du bord supérieur de la feuille. Pour éviter une adsorption irréversible sur la ligne de départ, le mélange propanediol-méthanol est déposé entre les lignes extrêmes puis essoré.

Les solutions de stéroïdes sont préparées dans l'éthanol à la concentration de 1 µg/µl. On dépose sur la ligne située à 4,5 cm du bord supérieur de la feuille environ 1 à 4 µg de stéroïdes, chaque dépôt étant séparé de son voisin de 4 cm.

La chromatographie est réalisée à 24° $\pm$ 1. La cuve est mise en équilibre 30 minutes pour la chromatographie avec papier non imprégné, 1 heure pour la chromatographie de partage. La vitesse de migration des acétates est exprimée par rapport à la migration du diacétate de 16α-hydroxy-estrone.

- Révélation

Bleu de TURNBULL

Les chromatogrammes sont séchés à 90° puis maintenus une nuit dans une atmosphère ammoniacale afin d'hydrolyser les acétates d'estrogènes. Ils sont ensuite laissés 1/4 d' heure sous courant d'air dans une hotte puis plongés dans un mélange extemporané volume à volume, de solution aqueuse à 1 % de ferricyanure de potassium et de chlorure ferrique. Après avoir été maintenu 30 minutes à l'air libre pour laisser se développer la couleur, le papier est séché entre deux feuilles de papier filtre. Pour conserver la coloration, le chromatogramme est lavé successivement par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 % puis par de l'eau chaude. Les taches apparaissent en bleu foncé sur fond bleu pâle. La sensibilité de la détection des stéroïdes est de l'ordre de 1 à 2 $\mu g/cm^2$.

Acide phospho-molybdique

Il permet de révéler directement les dérivés méthylés ou acétylés.

Le chromatogramme est vaporisé légèrement avec une solution à 5 % d'acide phospho-molybdique dans l'éthanol. Il est ensuite chauffé à 60°-100° pendant 5 minutes.

- Symboles et abréviations utilisés dans les tableaux

$$R_F = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

$$R_T = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le témoin}}$$

D_S = déviation standard calculée d'après l'expression :

$$\sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

n = nombre d'essais effectués.

Résultats

1) Papier non imprégné, conditions particulières de la chromatographie.

Nous avons étudié l'influence de la quantité de stéroïde déposée sur le R_F et sur la dimension des taches. Pour ce travail, nous avons utilisé le papier Whatman n° 1 sur lequel nous avons déposé dans un ordre irrégulier des quantités croissantes de stéroïdes. Nous avons également cherché à vérifier le rôle de l'humidité atmosphérique en introduisant dans la cuve soit un bécher contenant de l'acide sulfurique concentré, soit une mèche imprégnée d'eau. Dans les deux cas, le papier est mis à équilibrer plusieurs heures avant la migration. Le stéroïde utilisé pour ce travail est la 16β-hydroxy-estrone acétate.

TABLEAU VII

ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA QUANTITE DE SUBSTANCE DEPOSEE, SUR LE R_F ET LA DIMENSION DES TACHES :

I) CUVE AVEC DESHYDRATANT

a) Solvant Triméthyl-pentane

Quantité déposée	1μg	2μg	3μg	4μg	
R_F *	0,63	0,63	0,64	0,66	
Longueur de la tache*	13mm	18mm	23mm	24mm	
Largeur	7mm	8mm	9mm	10mm	
Migration moyenne*	25cm				

b) Solvant Ligroïne

Quantité déposée	2μg	3μg	4μg	6μg	8μg
R_F*	0,73	0,74	0,72	0,73	0,72
Longueur de la tache*	18mm	19mm	24mm	27mm	28mm
Largeur	11mm	11mm	11mm	11mm	11mm
Migration moyenne*	27cm				

II) CUVE AVEC CHANDELLE DE PAPIER HUMIDE

Solvant Ligroïne

Quantité déposée	2μg	3μg	4μg	6μg	8μg
Migration*	121mm	127mm	137mm	151mm	160mm
Longueur*	28mm	33mm	40mm	56mm	63mm

* Le R_F et la longueur des taches sont difficiles à mesurer à cause de l'importance de la trainée.
On mesure la migration à la pointe de la tache.

Nous voyons d'après ces résultats que le R_F n'est pas sensiblement influencé par des dépôts variant de 1 à 8 µg. Au-delà de cette limite, la vitesse de migration et la longueur de la tache augmentent notablement.

Le degré d'humidité influence la migration et la diffusion de la tache.

2) Etude comparative de la chromatographie de partage et d'adsorption

- Chromatographie de partage des estrogènes acétylés

Après étude de plusieurs systèmes, nous avons retenu le système de chromatographie de partage décaline-propanediol. Ce système lent (12 à 16 heures) nous a permis d'obtenir une séparation correcte de la majorité des estrogènes acétylés étudiés.

Les temps de rétention relatifs sont calculés par rapport à celui de l'acétate de la 16α-hydroxy-estrone et sont décrits dans le tableau VIII :

TABLEAU VIII

CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE DES ESTROGENES ACETYLES DANS LE SYSTEME
Décaline-Propanediol

Stéroïdes	R_T	D S	n
Estrone	1,38	± 0,03	6
Estradiol	1,80	± 0,06	6
16α-hydroxy-estrone	1		
16β-hydroxy-estrone	1,07	± 0,04	7
16-céto-estradiol	0,93	± 0,05	7
Estriol	1,53	± 0,06	8
16-épi-estriol	1,42	± 0,05	6
17-épi-estriol	1,32	± 0,04	7
16,17-épi-estriol	1,50	± 0,06	7

Dans ce système l'estrone et l'estradiol sont très bien séparés entre eux, l'estradiol étant le moins polaire de tous les estrogènes étudiés. L'estrone s'intercale entre le 16 et le 17-épi-estriol qui sont séparés entre eux. Les α-cétols sont les estrogènes les plus polaires et sont bien isolés des autres composés. A l'intérieur de ce groupe nous isolons la 16β-hydroxy-estrone du 16-céto-estradiol. La séparation des deux estriols trans est nulle.

- Chromatographie d'adsorption des estrogènes acétylés

Pour cette étude, nous avons utilisé successivement les papiers Whatman n° 1, n° 2 et n° 20 et Schleicher et Schull n° 2043 b.

Nous avons fait varier les solvants en employant la décaline, le triméthyl-pentane, le méthylcyclohexane et l'heptane. Les résultats obtenus avec ces différents solvants sont très voisins tant au point de vue des polarités respectives que de l'efficacité de la séparation des stéroïdes.

Le tableau IX donne les résultats obtenus avec l'heptane.

TABLEAU IX

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER NON IMPREGNE DE PHASE STATIONNAIRE DES ACETATES D'ESTROGENES AVEC L'HEPTANE COMME SOLVANT

Stéroïdes	R_T	D S	n
Estrone	1,46	± 0,04	7
Estradiol	1,57	± 0,05	7
16α-hydroxy-estrone	1		
16β-hydroxy-estrone	0,75	± 0,04	17
16-céto-estradiol	0,69	± 0,05	13
Estriol	1,07	± 0,04	8
16-épi-estriol	0,74	± 0,06	14
17-épi-estriol	1,03	± 0,04	9
16,17-épi-estriol	1,25	± 0,05	11

Le tableau X compare la polarité des estrogènes acétylés selon les deux méthodes.

TABLEAU X

COMPARAISON DE LA POLARITE DES ESTROGENES ACETYLES
(Les estrogènes sont rangés dans l'ordre de leur polarité décroissante).

ESTROGENES ACETYLES	
Chromatographie de partage Décaline-propanediol	Chromatographie d'adsorption Heptane
16-céto-17β-estradiol	16-céto-17β-estradiol
16α-hydroxy-estrone	16β-hydroxy-estrone
16β-hydroxy-estrone	16-épi-estriol
17-épi-estriol	16α-hydroxy-estrone
Estrone	17-épi-estriol
16-épi-estriol	Estriol
16,17-épi-estriol	16,17-épi-estriol
Estriol	Estrone
Estradiol	Estradiol

Nous pouvons constater à la lecture de ce tableau des modifications sensibles dans l'ordre des polarités respectives des estrogènes suivant les deux systèmes. En particulier, entre les deux épimères 16α- et 16β-hydroxy-estrone ainsi qu'entre le 16-épi-estriol et le 17-épi-estriol. En utilisant ces deux systèmes, nous obtenons un bon fractionnement de l'ensemble des estrogènes étudiés.

Nous voyons ainsi que l'utilisation de papier non imprégné de phase stationnaire modifie sensiblement l'ordre de migration des différents estrogènes par rapport aux systèmes classiques de

chromatographie de partage. L'utilisation de ces deux procédés nous a permis de séparer les différents acétates des estrogènes étudiés.

- Séparation par chromatographie sur papier non imprégné des 3-méthyl-éthers de l'estrone, des estradiols-17 et de leurs dérivés acétylés

TABLEAU XI

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER NON IMPREGNE DE L'ESTRONE ET DES DEUX ISOMERES ESTRADIOL APRES FORMATION DU DERIVE 3-METHYL-ETHER, AVANT OU APRES ACETYLATION.

STEROIDES	R_F	D S	n
Estrone-3-méthyl-éther	0,63	± 0,01	10
Estradiol-17β-3-méthyl-éther	0,45	± 0,02	12
Estradiol-17α-3-méthyl-éther	0,38	± 0,03	13
Estradiol-3-méthyl-éther-17β-acétate	0,68	± 0,02	14
Estradiol-3-méthyl-éther-17α-acétate	0,77	± 0,02	10

Solvant : cyclohexane

Cf. page 48 pour les abréviations et les symboles

Avec le cyclohexane, nous obtenons une bonne séparation des différents phénolstéroïdes étudiés. Il est à noter que l'estradiol-17α est plus polaire que l'estradiol-17β, ce qui est contraire aux observations faites en chromatographie de partage. Après acétylation de l'alcool en 17, les polarités respectives des deux estradiols isomères sont inversées mais l'efficacité de la séparation est conservée.

B) Chromatographie des estrogènes sur papier à fibres de verre non imprégné de phase stationnaire

Partie expérimentale

- Purification des solvants utilisés

Cf. page 46

- Méthode

Nous utilisons le papier à fibres de verre Schleicher et Schull n° 6, en feuilles de 20 cm sur 48 cm.

Les solutions de stéroïdes sont préparées dans l'éthanol à la concentration de 1 µg/µl. On dépose sur la feuille environ 1 à 2 µg.

Les parois latérales de la cuve sont tapissées de papier saturé de solvant. La cuve est placée dans une ambiance thermostatée à 24° ± 2°.

La chromatographie est mise en route dès l'introduction de la feuille dans la cuve.

La révélation des taches se fait par pulvérisation d'acide sulfurique à 5 % dans un mélange d'eau et d'alcool, volume à volume, suivie de chauffage du chromatogramme 5 minutes à 100°. La réaction est positive pour des quantités minima de stéroïdes de l'ordre de 0,1 à 0,3 µg.

La migration se fait, suivant les systèmes, en une à deux heures, sur 32 à 40 cm.

Résultats

1) Stéroïdes libres

Les résultats obtenus pour la séparation des estrogènes libres par chromatographie sur papier à fibres de verre non imprégné de phase stationnaire sont analogues à ceux décrits dans la littérature avec les systèmes classiques (36), tant au point de vue des polarités respectives que de l'efficacité de la séparation. Nous n'avons pu cependant obtenir de séparation entre les estradiols isomères en 17. Par contre nous avons séparé l'estradiol-16α des autres estradiols dans le système benzène-acétate d'éthyle. Les tableaux XII et XIII indiquent les résultats obtenus avec, comme solvant, le benzène pour le tableau XII et le benzène-acétate d'éthyle 9/1 v/v pour le tableau XIII

TABLEAU XII

CHROMATOGRAPHIE DES ESTROGENES LIBRES SUR PAPIER A FIBRES DE VERRE

STEROIDES	R_F	D S	n
17-désoxo-estrone	0,91	± 0,01	8
Estrone	0,47	± 0,02	10
Estrone-16	0,46	± 0,02	9
Estradiol-17β	0,27	± 0,01	10
Estradiol-16β	0,25	± 0,01	9
Estradiol-17α	0,26	± 0,02	10
Estradiol-16α	0,21	± 0,01	10
16α-hydroxy-estrone	0,06	± 0,01	7
16β-hydroxy-estrone	0,05	± 0,01	5
16-céto-estradiol	0,05	± 0,01	11
16-céto-estrone	0,18	± 0,04	4

Solvant utilisé : benzène

Cf. page 48 pour les abréviations et les symboles

TABLEAU XIII

STEROIDES	R_F	D S	n
17-désoxo-estrone	0,94	$\pm$ 0,01	7
Estrone	0,92	$\pm$ 0,02	9
Estrone-16	0,90	$\pm$ 0,02	10
Estradiol-17β	0,82	$\pm$ 0,03	10
Estradiol-16β	0,82	$\pm$ 0,03	10
Estradiol-17α	0,82	$\pm$ 0,01	10
Estradiol-16α	0,73	$\pm$ 0,03	10
16α-hydroxy-estrone	0,51	$\pm$ 0,07	4
16β-hydroxy-estrone	0,40	$\pm$ 0,04	4
16-céto-estradiol	0,45	$\pm$ 0,04	6
Estriol	0,09	$\pm$ 0,03	8
16-épi-estriol	0,15	$\pm$ 0,03	11
17-épi-estriol	0,14	$\pm$ 0,03	9
16,17-épi-estriol	0,13	$\pm$ 0,03	13
Solvant : benzène-acétate d'éthyle 9/1 v/v			

2) Estrogènes méthylés en position 3

La méthylation diminue très sensiblement la polarité des estrogènes mais ne modifie pas le rapport des migrations entre les différents estrogènes. Nous avons cependant obtenu avec le benzène une certaine séparation des isomères de l'estradiol. La 16-céto-estrone a une polarité intermédiaire entre les estradiols et les α-cétols.

Le tableau XIV indique les R_F obtenus par chromatographie sur papier à fibres de verre avec le benzène comme solvant.

TABLEAU XIV

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER A FIBRES DE VERRE DES ESTROGENES METHYLES EN POSITION 3.

STEROIDES	R_F	D S	n
17-désoxo-estrone	0,95	± 0,03	6
Estrone	0,91	± 0,02	10
Estrone-16	0,91	± 0,01	10
Estradiol-17β	0,78	± 0,03	10
Estradiol-16β	0,81	± 0,03	11
Estradiol-17α	0,82	± 0,02	11
Estradiol-16α	0,75	± 0,02	11
16α-hydroxy-estrone	0,39	± 0,02	9
16β-hydroxy-estrone	0,28	± 0,02	11
16-céto-estradiol	0,37	± 0,02	6
16-céto-estrone	0,62	± 0,02	10
Estriol	0,02	± 0,01	10
16-épi-estriol	0,05	± 0,01	10
17-épi-estriol	0,04	± 0,01	10
16,17-épi-estriol	0,06	± 0,01	10

Solvant : benzène.

3) Acétates d'estrogènes méthylés en positiion 3

L'acétylation des alcools secondaires apporte des modifications importantes dans la polarité respective des estrogènes. En effet si le groupe des estradiols demeure le moins polaire, les isomères trans des estriols ont une polarité beaucoup plus faible et s'intercalent entre le groupe de l'estradiol et de ses isomères et celui des α-cétols. L'estriol et le 16-épi-estriol sont bien séparés. On observe donc une inversion de la polarité et les deux cis estriols deviennent les composés les plus polaires de la série. Ils ne sont pas séparés entre eux. En revanche, les deux isomères trans

sont bien séparés l'un de l'autre. Le tableau XV indique les R_F obtenus par chromatographie dans le système benzène-heptane 9:1.

TABLEAU XV

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER A FIBRES DE VERRE DES ACETATES-ESTROGENES METHYLES EN 3.

STEROIDES	R_F	D S	n
Estradiol-17β	0,86	± 0,01	14
Estradiol-16β	0,84	± 0,01	14
Estradiol-17α	0,86	± 0,01	14
Estradiol-16α	0,85	± 0,01	14
16α-hydroxy-estrone	0,49	± 0,04	14
16β-hydroxy-estrone	0,48	± 0,04	14
16-céto-estradiol	0,45	± 0,03	10
Estriol	0,61	± 0,03	14
16-épi-estriol	0,35	± 0,04	14
17-épi-estriol	0,37	± 0,04	14
16,17-épi-estriol	0,53	± 0,03	13
Solvant : benzène-heptane 9:1 v/v.			

4) Estrogènes acétylés

L'estrone qui ne possède qu'une fonction acétylable voit sa polarité diminuée d'une façon peu importante par rapport au composé de base et devient plus polaire que l'estradiol. Il en est de même pour la 16-céto-estrone qui migre une fois acétylée à la même vitesse que les α-cétols. Il est normal de retrouver dans le groupe des estriols acétylés la même inversion de polarité que celle observée pour les dérivés méthylés et acétylés. Dans ce système, les estrogènes étudiés se séparent en cinq fractions :

- la 17-désoxo-estrone
- le groupe de l'estradiol et de ses isomères
- l'estrone et l'estrone-16
- le groupe des α-cétols qui comprend aussi la 16-céto-estrone et les estriols isomères en cis
- les deux estriols en trans.

Le tableau XVI indique les R_F obtenus par chromatographie sur papier à fibre de verre dans le système benzène-méthylcyclohexane 50:50 v/v.

TABLEAU XVI

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER A FIBRES DE VERRE DES ESTROGENES ACETYLES.

STEROIDES	R_F	D S	n
Estrone-17-désoxo	0,93	± 0,01	4
Estrone	0,53	± 0,02	4
Estrone-16	0,54	± 0,03	4
Estradiol-17β	0,80	± 0,03	4
Estradiol-16β	0,73	± 0,03	4
Estradiol-17α	0,77	± 0,01	4
Estradiol-16α	0,74	± 0,02	4
16α-hydroxy-estrone	0,22	± 0,01	4
16β-hydroxy-estrone	0,23	± 0,02	4
16-céto-estradiol	0,20	± 0,02	4
16-céto-estrone	0,23	± 0,01	4
Estriol	0,40	± 0,03	4
16-épi-estriol	0,22	± 0,02	4
17-épi-estriol	0,24	± 0,02	4
16,17-épi-estriol	0,41	± 0,02	4

Solvant : benzène-méthylcyclohexane 1:1 v/v

En résumé, le tableau XVII permet la comparaison de la polarité des principaux estrogènes et de leurs acétates, l'étude étant faite soit par un système classique (40) soit par chromatographie d'adsorption sur papier à fibres de verre.

Le tableau XVIII indique les R_F obtenus dans différents systèmes avant et après formation de dérivés. La figure 2 , établie d'après ces résultats, schématise le procédé que l'on peut suivre pour séparer en deux ou trois étapes seulement, l'ensemble des estrogènes étudiés.

TABLEAU XVII

COMPARAISON DE LA POLARITE* DE QUELQUES ESTROGENES ET DE LEURS DERIVES ACETYLES SUIVANT DIFFERENTS SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES

Estrogènes libres papier cellulosique Chloroforme-formamide	Estrogènes libres papier à fibres de verre Benzène-acétate d'éthyle 9:1	Estrogènes acétylés papier à fibres de verre Benzène-méthylcyclohexane 1:1
Estriol-16α,17β (40-62)**	Estriol-16α,17β	16-céto-estradiol
Estriol-16β,17α (40-62)	Estriol-16β,17α	16α-hydroxy-estrone
Estriol-16β,17β (40-62)	Estriol-16β,17β	Estriol-16β,17β
Estriol-16α,17α (40-62)	Estriol 16α,17α	16-céto-estrone
16β-hydroxy-estrone (40)	16β-hydroxy-estrone	16β-hydroxy-estrone
16-céto-estradiol (40)	16-céto-estradiol	Estriol-16α,17α
16α-hydroxy-estrone (40)	16α-hydroxy-estrone	Estriol-16β,17α
Estradiol-17β (63)	Estradiol-17β	Estriol-16α,17β
Estradiol-17α (63)	Estradiol-17α	Estrone
Estrone (63)	Estrone	Estradiol-17α
		Estradiol-17β

* Les estrogènes sont rangés dans l'ordre de leur polarité décroissante.

** ( ) Les chiffres entre parenthèses indiquent les numéros de référence des auteurs.

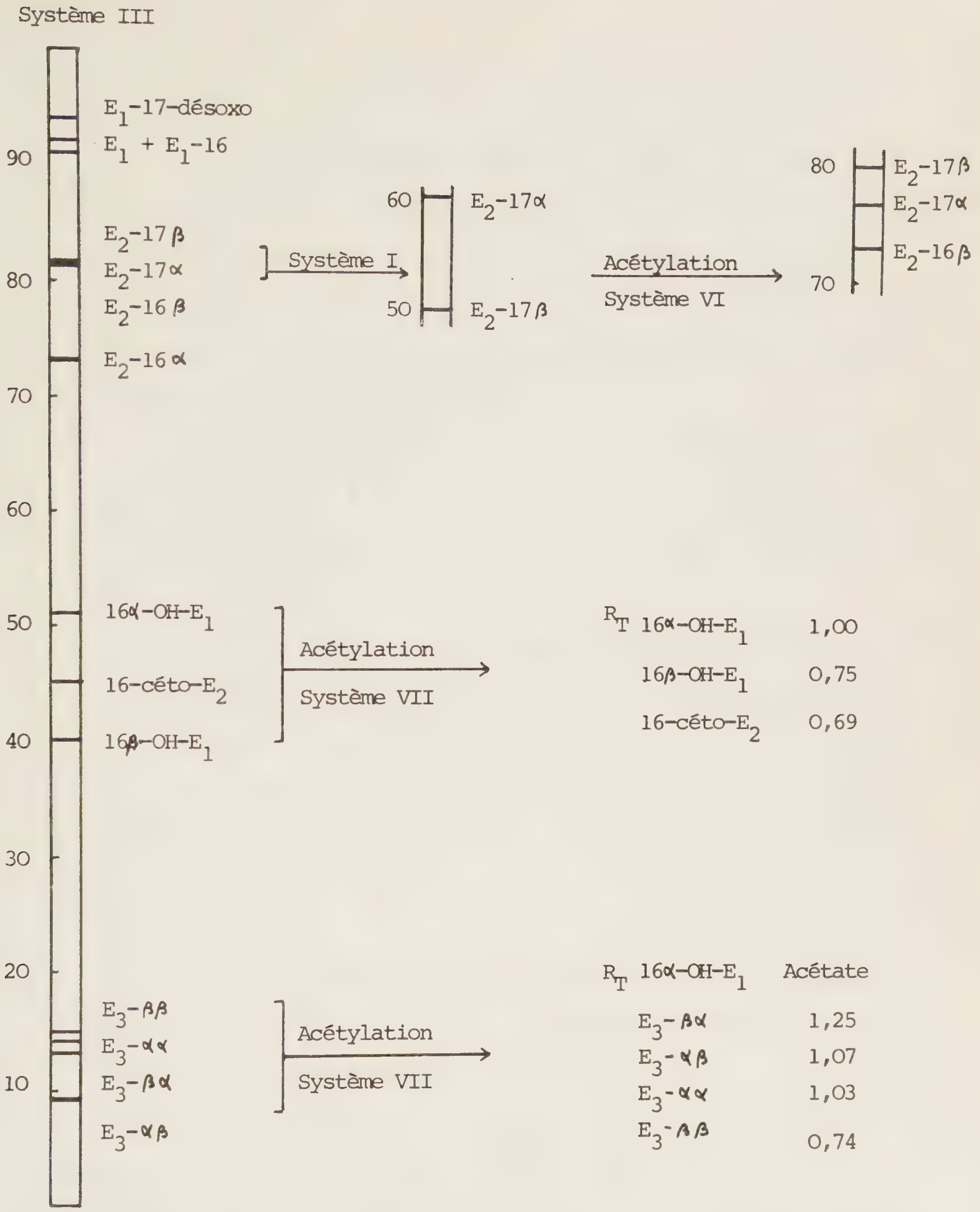
TABLEAU XVIII

TABLEAU COMPARATIF DES R_F (ou R_T) DES ESTROGENES DANS DIFFERENTS SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES SUR PAPIER

	Composés libres			Méthyl éther	Méthyl éther-acétate	Acétates		
	I	II	III	IV	V	VI	VII*	VIII*
17-désoxo-estrone			0,94	0,95		0,93		
Estrone	0,80	0,78	0,92	0,91		0,53	1,46	1,38
Estrone-16			0,91	0,91		0,54		
Estradiol-17β	0,50	0,54	0,82	0,78	0,86	0,80	1,57	1,80
Estradiol-16β			0,82	0,81	0,84	0,73		
Estradiol-17α	0,60		0,82	0,82	0,86	0,77		
Estradiol-16α		0,50	0,73	0,75	0,85	0,74		
16α-hydroxy-estrone	0,40		0,51	0,39	0,49	0,22	1,00	1,00
16β-hydroxy-estrone	0,33		0,40	0,28	0,48	0,23	0,75	1,07
16-céto-estradiol	0,33	0,31	0,45	0,37	0,45	0,20	0,69	0,93
16-céto-estrone		0,49		0,62		0,23		
Estriol	0,04	0,02	0,09	0,02	0,61	0,40	1,07	1,53
16-épi-estriol	0,17	0,17	0,15	0,05	0,35	0,22	0,74	1,42
17-épi-estriol	0,22		0,14	0,04	0,37	0,24	1,03	1,32
16,17-épi-estriol	0,04		0,13	0,06	0,53	0,41	1,25	1,50

Systèmes :
- I Partage chloroforme/formamide
- II Partage isooctane-toluène-méthanol-eau
- III Papier fibres de verre sec : benzène-acétate d'éthyle 9:1
- IV " " " " : benzène
- V " " " " : benzène-heptane 9:1
- VI " " " " : benzène-méthylcyclohexane 50:50
- VII Papier cellulose : heptane
- VIII Partage décaline/propanediol

* R_T donné par rapport à l'acétate de la 16α-hydroxy-estrone.



Système I : chromato. de partage chf/Fd - Système III : chromato. d'adsorption sur papier fibre de verre, benzène-acétate d'éthyle 9:1
Système VI : benzène-méthylcyclohexane 1/1 - Système VII : papier cellulose-heptane

Fig. 2 - Fractionnement des estrogènes et de leurs dérivés acétyles

C) Discussion

La chromatographie sur papier non imprégné de phase stationnaire mise au point par PASQUALINI et JAYLE [35] relève plutôt du domaine de la chromatographie d'adsorption que de la chromatographie de partage. Nous avons montré, en 1962 [49], que ce procédé pouvait être utilisé avec succès pour le fractionnement des stéroïdes phénoliques acétylés.

La comparaison des résultats obtenus avec ceux donnés par un système de partage classique permet de faire quelques observations :

- la migration du solvant est beaucoup plus rapide que sur papier imprégné de phase stationnaire;
- l'efficacité du fractionnement est du même ordre que celle donnée par le système classique mais la séquence des migrations respectives est parfois modifiée. On peut noter en particulier une inversion de la polarité des deux épimères, 16 ξ -OH-estrone ainsi qu'entre les épimères 16- et 17-épi-estriol (tableau X);
-

Nous avons poursuivi notre étude en substituant au papier cellulosique du papier à fibres de verre. En effet, le papier à base de cellulose présente deux inconvénients : il résiste mal aux réactifs colorés agressifs et présente dans ses fibres un certain nombre d'impuretés; celles-ci peuvent suivre le stéroïde lors de son extraction du papier et perturber d'une façon importante le dosage ultérieur. Cela est vrai, en particulier pour le dosage de petites quantités de stéroïdes par fluorimétrie ou chromatographie gazeuse. Le papier à fibres de verre ne présente pas ces inconvénients mais il est d'une manipulation plus délicate.

Pour ces deux procédés, la capacité de charge du papier sec ne dépasse pas quelques microgrammes de stéroïdes.

Par chromatographie d'adsorption sur papier à fibres de verre, les estrogènes libres sont élués dans l'ordre suivant (polarité décroissante) : estriol et ses isomères > groupe des α-cétols > estradiol-17β et ses isomères-17α,16β,16α > estrone et son isomère en 16 (tableau XVIII).

A l'intérieur du groupe α-cétols, la 16β-hydroxy-estrone présente une polarité supérieure à celle de la 16α-hydroxy-estrone. Les estriols cis-glycols ont une vitesse de migration supérieure à celle des estriols trans-glycols.

En définitive, l'ordre de migration des estrogènes obtenu par ce procédé est identique à celui décrit par de nombreux auteurs (36) utilisant les systèmes classiques de chromatographie de partage.

Les comparaisons du tableau XVIII montre que la méthylation de l'hydroxyle phénolique diminue sensiblement la polarité des estrogènes. Cependant leur vitesse de migration respective n'est pas modifiée. Après acétylation cette séquence est profondément transformée; l'estérification des fonctions alcools du stéroïde inhibe la formation de liaisons hydrogène entre les hydroxyles et l'adsorbant. La polarité de la fonction cétonique est alors mise en évidence. C'est ainsi que l'estrone devient plus polaire que l'estradiol et que l'estriol et ses isomères présentent une vitesse de migration supérieure à celle du groupe des α-cétols. On retrouve également cette inversion de polarité à l'intérieur du groupe des isomères de l'estriol.

Au point de vue de l'efficacité de la séparation, les résultats obtenus par la chromatographie sur papier non imprégné de phase stationnaire sont excellents. En effet, en utilisant deux ou trois systèmes, nous avons pu séparer la plupart des stéroïdes phénoliques oxygénés en position 16- et/ou 17-, sous leur forme libre ou après acétylation. Nous avons schématisé dans la figure **2** un exemple de manipulation à effectuer pour obtenir la séparation de ces composés.

Dans un premier temps, on peut avec le papier à fibres de verre et le mélange benzène-acétate d'éthyle 9-1 (système III) séparer les estrogènes en quatre fractions ainsi constituées :

1. Estrone; estrone-16; 17-désoxo-estrone
2. Estradiol-17β, estradiol-17α, estradiol-16β, estradiol-16α **et** estrone-16.
3. 16-céto-estradiol, 16α-hydroxy-estrone, 16β-hydroxy-estrone
4. l'estriol et ses isomères.

1. Fractionnement de la 17-désoxo-estrone et de l'estrone-16.

La séparation est obtenue en acétylant ces composés et en les chromatographiant sur papier à fibres de verre avec le benzène comme solvant. L'estrone libre n'a pu être isolé de l'estrone-16 dans aucun des systèmes étudiés.

Une purification supplémentaire de l'estrone d'origine biologique peut être obtenue en la méthylant et en la soumettant à une réaction d'estérification. Seules les impuretés possèdant un groupe OH seront acétylées et présenteront en chromatographie une polarité différente.

2. Fractionnement de la 16-céto-estrone, des estradiols-17β,-17α, -16β et -16α.

Dans le système III, l'estradiol-16α est séparé des autres

composés.

Après acétylation et chromatographie dans le système VI, on obtient le fractionnement des estradiols-17β et -16β tandis que la 16-céto-estrone qui ne possède qu'une fonction OH devient le composé le plus polaire du groupe. Enfin, l'estradiol et son isomère 17α sont séparés après méthylation par chromatographie d'adsorption sur papier cellulose.

3. Fractionnement des 16-céto-estradiol, 16α-hydroxy-estrone et 16β-hydroxy-estrone.

La séparation des isomères ξ OH-estrone est obtenue dans le système III. L'isolement de la 16β-hydroxy-estrone et du 16-céto-estradiol est assuré par chromatographie d'adsorption sur papier cellulose de leurs dérivés acétylés.

4. Fractionnement de l'estriol et de ses isomères.

Le groupe de l'estriol est le plus polaire de la série étudiée. Sa polarité est diminuée après méthylation mais d'une façon moins importante que celle des composés possèdant une seule fonction OH en plus de l'hydroxyle phénolique.

Le fractionnement complet des quatre estriols est obtenu par chromatographie d'adsorption des dérivés acétylés dans les systèmes VI et VII.

CONCLUSION

La chromatographie sur papier non imprégné de phase stationnaire est un procédé qui peut être assimilé à une chromatographie d'adsorption. Elle permet d'obtenir un bon fractionnement des stéroïdes phénoliques dans un délai très court (1 à 2 heures).

Le papier à fibres de verre présente l'avantage d'avoir une grande résistance chimique. Celle-ci facilite sa purification, si cela est nécessaire, et la révélation des stéroïdes.

Les dérivés des estrogènes méthylés en 3 ou acétylés présentent des caractéristiques intéressantes en chromatographie. Ils favorisent la séparation et l'identification des estrogènes en modifiant d'une façon importante les propriétés chromatographiques de ces composés.

II) - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Depuis que DEMOLE (64) et STAHL (65) ont vulgarisé l'emploi de la chromatographie en couche mince, celle-ci a connu un très grand développement et a fait l'objet de très nombreuses applications, particulièrement dans le domaine de la biochimie où dans beaucoup de cas elle s'est substituée à la chromatographie sur papier. Elle a l'avantage d'être plus maniable, plus rapide que la chromatographie sur papier et de permettre l'emploi de nombreux réactifs. Cela ne constitue pas une supériorité sur la chromatographie sur papier à fibres de verre.

La séparation des estrogènes sur couche mince de gel de silice a été étudiée par de nombreux auteurs. Le travail le plus important a été fait par LISBOA et DICZFALUSY (66) qui ont proposé une série de systèmes permettant d'obtenir la séparation de la plupart des estrogènes étudiés. Cependant, l'estradiol et son isomère 17α, les α-cétols, les deux isomères de l'estriol en position cis, l'estriol et le 16,17-épi-estriol ne sont pas bien séparés.

L. STARKA (67) a étudié le comportement chromatographique de quelques estrogènes en utilisant l'alumine sans liant comme adsorbant. Les résultats obtenus ne sont pas sensiblement différents de ceux décrits par LISBOA qui emploie le gel de silice. Il en est de même pour les résultats décrits par LUISI et al (68) qui font migrer les stéroïdes sur chromatoplaques disposées horizontalement. Y.C. TUNG (69) utilise des couches minces de polyamides pour séparer l'estrone, l'estradiol et l'estriol avec les mélanges chloroforme-n-butanol 95:5 v/v ou éthanol-eau.

Les dérivés 3-méthyl-éthers de l'estrone, de l'estradiol, de l'estriol, du 16 et du 17-épi-estriol ont été étudiés par LISBOA (70) ainsi que les acétates de l'estrone, de l'estradiol et de son isomère 17α, des 16 ξ -hydroxy-estrones, de la 16-céto-estrone et de l'estriol. WOTIZ (71) a également étudié la séparation de quelques estrogènes acétylés. Les 3-méthyl-éthers des quatre estriols ont été séparés par HERTELENDY et COMMON (72) dans le mélange cyclohexane-acétate d'éthyle-éthanol 45-50-5.

TOUCHSTONE et al (73) ont obtenu une bonne séparation de l'estradiol-17β de son isomère 17α en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant.

La gamme des réactifs utilisables pour la révélation des estrogènes sur chromatographie en couche mince est beaucoup plus étendue que celle pour la chromatographie sur papier. Cela est dû à la nature de l'adsorbant qui permet l'emploi de réactifs corrosifs. Un certain nombre de réactifs ont été proposés (74-75-76). Certains sont spécifiques des phénolstéroïdes ou d'une fonction donnée, d'autres dits "non spécifiques" réagissent avec l'ensemble des stéroïdes mais en donnant parfois des colorations différentes. LISBOA et HEFTMANN (76) ont fait une étude systématique des méthodes proposées et ont décrit les colorations obtenues pour un grand nombre d'estrogènes. Ils ont montré que des stéroïdes de structures très voisines pouvaient donner des colorations différentes avec certains réactifs. Ces différences sont parfois très utiles pour confirmer l'identité de certains estrogènes. Les méthodes proposées permettent en général de détecter des quantités minimales de stéroïdes de 0,5 à quelques µg.

La chromatographie en couche mince a été utilisée par un certain nombre d'auteurs pour l'analyse des estrogènes dans les milieux biologiques. Cette technique a été employée au cours de l'étape finale de l'analyse comme moyen de séparation et d'identification, l'analyse semi-quantitative pouvant se faire directement sur la plaque au moyen de réactions colorées ou de fluorescence [77 à 79]. Cependant pour l'évaluation de quantités inférieures au microgramme, la chromatographie en couche mince est utilisée seulement comme moyen de purification. Après élution de la plaque, les estrogènes sont alors dosés soit par fluorimétrie [68-55-80], soit par chromatographie en phase gazeuse [81-84].

La chromatographie en couche mince présente certains invonvénients. Par exemple, l'élution des stéroïdes est irrégulière [85]. On note parfois une destruction de certains phénolstéroïdes surtout dans le cas de quantités très faibles [86]. Enfin le problème le plus délicat est probablement la présence d'impuretés dans le gel de silice qui subsistent même après lavage de celui-ci. En effet, ces impuretés peuvent être extraites en même temps que les stéroïdes et gêner les analyses ultérieures en particulier la chromatographie gazeuse.

Nous avons étudié le comportement en chromatographie en couche mince des estrogènes possèdant une fonction oxygénée en position 16 ou 17, de leurs dérivés méthylés en 3, méthylés en 3 et acétylés, ou totalement acétylés. En effet, si un grand nombre d'estrogènes libres ont fait l'objet d'une étude systématique, il n'en est pas de même des différents dérivés méthylés ou acétylés ou seuls quelques représentants de différents groupes ont été étudiés. Il était donc intéressant d'étudier et de comparer le comportement de ces différents dérivés, souvent utilisés en analyse.

Au cours de ce travail nous avons fait de très nombreux essais en faisant varier les solvants et les mélanges de solvants; les adsorbants et les mélanges d'adsorbants (ex : gel de silice, célite, alumine, charbon actif); le pH, en ajoutant à l'adsorbant certaines substances comme le nitrate d'argent ou en rendant l'adsorbant hydrophobe par la silanization du gel de silice. Ces différents essais ne nous ont pas apporté de solutions particulièrement satisfaisantes et les meilleurs résultats obtenus l'ont été avec les systèmes classiques. Nous ne décrirons que ces derniers.

Nous avons également étudié les colorations obtenues pour les estrogènes utilisés, avec quelques réactifs choisis parmi les plus sélectifs.

Partie expérimentale

- Purification des solvants utilisés

Benzène - Le benzène (RP de Prolabo) est purifié selon la technique décrite page 46

Acétate d'éthyle - Cf. page 46

Chlorure de méthylène - Le chlorure de méthylène pur (Prolabo) est distillé après séchage sur chlorure de calcium.

- Méthode

Nous utilisons des plaques de verre de 20 x 20 cm recouvertes d'une couche de 0,25 mm d'alumine, de gel de silice ou de gel de silice silanizé, tous ces adsorbants provenant de la maison MERCK (Darmstadt).

Sauf exceptions, les cuves de développement ne sont pas saturées. Leurs dimensions intérieures sont : 20,7 x 20,7 x 5,4 cm.

Les solutions de stéroïdes sont préparées dans l'éthanol à la concentration de 1 µg par µl. On dépose sur la plaque environ 2 à 3 µg.

La migration se fait en 30 à 45 minutes à la température ambiante (20-23°C).

La révélation se fait soit par l'aldéhyde anisique en solution dans l'acide acétique à 2 % contenant 1 % d'acide sulfurique, soit par l'acide sulfurique à 5 % dans un mélange d'eau et d'alcool 1:1. Le réactif constitué de 100 ml d'éthanol, 10 ml d'acide sulfurique et 10 ml d'anhydride acétique est également utilisé. Après vaporisation, la plaque est chauffée cinq minutes à 110° Les taches sont visibles pour des quantités de stéroïdes de l'ordre de 0,5 à 2 µg.

- Symboles et abréviations utilisées dans les tableaux

Cf. page 48

Résultats

1. Estrogènes

Le tableau XIX indique les résultats obtenus dans le système benzène-acétate d'éthyle, 6:4 (v/v) sur gel de silice.

TABLEAU XIX

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES ESTROGENES LIBRES SUR GEL DE SILICE

STEROIDES	R_F	D S	n
17-désoxo-estrone	0,96	± 0,01	5
Estrone	0,87	± 0,03	11
Estrone-16	0,87	± 0,02	10
Estradiol	0,62	± 0,02	11
Estradiol-16β	0,62	± 0,03	11
Estradiol-17α	0,69	± 0,03	11
Estradiol-16α	0,57	± 0,03	11
16α-hydroxy-estrone	0,55	± 0,03	11
16β-hydroxy-estrone	0,47	± 0,02	11
16-céto-estradiol	0,55	± 0,03	11
16-céto-estrone	0,80	± 0,04	9
Estriol	0,09	± 0,02	11
16-épi-estriol	0,30	± 0,02	11
17-épi-estriol	0,33	± 0,02	11
16,17-épi-estriol	0,13	± 0,01	11
Système de solvant : benzène-acétate d'éthyle, 6:4 (v/v).			

Ces résultats sont analogues à ceux décrits par LISBOA (66) dans des systèmes voisins. Cependant nous obtenons une séparation nette entre l'estradiol et son isomère -17α, ainsi qu'entre les 16-hydroxy-estrone. L'estrone-16 et l'estradiol-16β ne se séparent pas de leurs homologues en 17; par contre l'estradiol-16α est isolé de l'estradiol-17β. Ces composés avec une fonction oxygénée en 16 n'avaient pas encore été étudiés en chromatographie sur couche mince.

En définitive, nous séparons les estrogènes en neuf fractions ; par ordre de polarité croissante, nous obtenons les fractions suivantes :

1. Estrone-17-désoxo
2. Estrone; estrone-16
3. 16-céto-estrone
4. Estradiol-17α
5. Estradiol et estradiol-16β
6. Estradiol-16α; 16α-hydroxy-estrone; 16-céto-estradiol
7. 16β-hydroxy-estrone
8. 16-épi-estriol; 17-épi-estriol
9. Estriol; 16,17-épi-estriol.

Nous avons également étudié ces composés sur chromatoplaques de gel de silice silanizé (tableau XX). Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, les résultats obtenus sont très voisins de ceux donnés par le silicagel normal. La polarité de l'adsorbant est cependant atténuée par la silanization puisqu'il faut diminuer le pourcentage de solvant polaire pour obtenir des R_F analogues à ceux décrits dans le tableau XIX

TABLEAU XX

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES ESTROGENES SUR GEL DE SILICE SILANIZE.

STEROIDES	R_F
17-désoxo-estrone	0,93
Estrone	0,84
Estrone-16	0,83
Estradiol-17β	0,55
Estradiol-16β	0,54
Estradiol-17α	0,62
Estradiol-16α	0,48
16α-hydroxy-estrone	0,53
16β-hydroxy-estrone	0,41
16-céto-estradiol	0,55
16-céto-estrone	0,80
Estriol	0,05
16-épi-estriol	0,23
17-épi-estriol	0,25
16,17-épi-estriol	0,11

Les R_F sont calculés sur quatre essais
Solvants : benzène-acétate d'éthyle, 85:15 (v/v)

2. Dérivés 3-méthyl-éthers des estrogènes

Le comportement chromatographique de ces dérivés est très voisin de celui des corps de base mais leur polarité est sensiblement diminuée. Pour étudier ces dérivés nous utilisons le mélange benzène-acétate d'éthyle 8/2. Les estrogènes sont séparés en neuf groupes identiques à ceux obtenus avec les estrogènes libres. Nous avons étudié également ces composés dans le système benzène-méthanol 98/2 (v/v). Les tableaux XXI et XXII indiquent les résultats obtenus pour ces dérivés.

TABLEAU XXI

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES ESTROGENES 3-METHYL-ETHERS

STEROIDES	R_F	D S	n
17-désoxo-estrone	0,97		
Estrone	0,82	± 0,04	11
Estrone-16	0,82	± 0,04	11
Estradiol-17β	0,49	± 0,03	11
Estradiol-16β	0,51	± 0,03	11
Estradiol-17α	0,58	± 0,03	11
Estradiol-16α	0,46	± 0,03	11
16α-hydroxy-estrone	0,42	± 0,04	13
16β-hydroxy-estrone	0,32	± 0,03	12
16-céto-estradiol	0,42	± 0,04	12
16-céto-estrone	0,72	± 0,01	12
Estriol	0,04	± 0,01	12
16-épi-estriol	0,18	± 0,03	12
17-épi-estriol	0,21	± 0,03	11
16,17-épi-estriol	0,06	± 0,01	12

Solvants : benzène+acétate d'éthyle 8/2 (v/v)

TABLEAU XXII

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES ESTROGENES 3-METHYL-ETHERS

STEROIDES	R_F	STEROIDES (suite)	R_F
17-désoxo-estrone	0,79	16α-hydroxy-estrone	0,27
Estrone	0,63	16β-hydroxy-estrone	0,19
Estrone-16	0,64	16-céto-estradiol	0,27
Estradiol-17β	0,30	Estriol	0,03
Estradiol-16β	0,31	16-épi-estriol	0,09
Estradiol-17α	0,38	17-épi-estriol	0,10
Estradiol-16α	0,27	16,17-épi-estriol	0,03

R_F calculés sur trois essais

Solvants benzène:méthanol 95:5 (v/v)

Cuve saturée

3. Estrogènes méthylés et acétylés

Comme il était prévisible, ces dérivés présentent une polarité fortement diminuée par la présence de groupes acétates. Cela nous a amenés à adopter le mélange benzène-acétate d'éthyle 95:5 pour développer le chromatogramme (Tableau XXIII). Dans ce système les deux estradiols-17 ξ sont séparés mais leur polarité respective est inversée. En effet, l'estradiol-17α devient plus polaire que son isomère β. Nous observons un effet analogue avec les 16 ξ -hydroxy-estrones et leur séparation devient impossible. On constate également une inversion dans la polarité des estriols. L'estriol devient le composé le moins polaire. Il est séparé des deux isomères en cis mais peu de l'estriol-16β,17α.

Ces dérivés méthylés et acétylés sont donc séparés en quatre fractions. Par ordre de polarité croissante, nous avons :

1 - Estradiol-17β
2 - Estradiol-16β; estradiol-17α; estradiol-16α
3 - 16α-hydroxy-estrone; 16β-hydroxy-estrone; 16-céto-estradiol; estriol.
4 - 16,17-épi-estriol; 16-épi-estriol; 17-épi-estriol.

TABLEAU XXIII

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES 3-METHYL-ETHERS, ACETATES D'ESTROGENES

STEROIDES	R_F	D S	n
Estradiol-17β	0,60	± 0,03	8
Estradiol-16β	0,56	± 0,02	9
Estradiol-17α	0,55	± 0,02	9
Estradiol-16α	0,53	± 0,02	9
16α-hydroxy-estrone	0,34	± 0,02	10
16β-hydroxy-estrone	0,36	± 0,02	10
16-céto-estradiol	0,33	± 0,01	10
Estriol	0,34	± 0,02	10
16-épi-estriol	0,28	± 0,02	10
17-épi-estriol	0,25	± 0,02	10
16,17-épi-estriol	0,30	± 0,02	10

Solvants : benzène:acétate d'éthyle 95:5 (v/v)

Le tableau XXIV donne les résultats obtenus avec le même système que celui décrit pour le fractionnement des estrogènes totalement acétylés.

TABLEAU XXIV

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES 3-METHYL-ETHERS, ACETATES D'ESTROGENES

STEROIDES	R_F	D S	n
Estradiol-17β	0,75	± 0,04	4
Estradiol-16β	0,71	± 0,02	5
Estradiol-17α	0,68	± 0,04	4
Estradiol-16α	0,68	± 0,05	5
16α-hydroxy-estrone	0,49	± 0,04	5
16β-hydroxy-estrone	0,51	± 0,02	5
16-céto-estradiol	0,49	± 0,02	5
Estriol	0,49	± 0,02	5
16-épi-estriol	0,40	± 0,02	5
17-épi-estriol	0,35	± 0,02	5
16,17-épi-estriol	0,41	± 0,04	5

Solvants : benzène:acétate d'éthyle 9:1 (v/v)

4. Estrogènes acétylés

Le tableau XXV donne les résultats obtenus pour les estrogènes acétylés avec le benzène-acétate d'éthyle 9:1. (v/v).

TABLEAU **XXV**

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES ESTROGENES ACETYLES

STEROIDES	R_F	D S	n
17-désoxo-estrone	0,95	± 0,02	11
Estrone	0,48	± 0,04	11
Estrone-16	0,47	± 0,02	10
Estradiol-17β	0,66	± 0,03	10
Estradiol-16β	0,63	± 0,02	11
Estradiol-17α	0,61	± 0,04	11
Estradiol-16α	0,60	± 0,04	10
16α-hydroxy-estrone	0,41	± 0,02	9
16β-hydroxy-estrone	0,42	± 0,03	9
16-céto-estradiol	0,39	± 0,02	10
16-céto-estrone	0,33	± 0,02	10
Estriol	0,42	± 0,03	11
16-épi-estriol	0,35	± 0,02	4
17-épi-estriol	0,34	± 0,02	9
16,17-épi-estriol	0,41	± 0,02	11
Solvants : benzène-acétate d'éthyle 9:1 (v/v)			

Dans le système benzène-acétate d'éthyle 9:1, nous obtenons des résultats voisins de ceux observés pour les dérivés méthylés et acétylés. L'estrone qui ne possède qu'un seul groupe acétoxy devient plus polaire que l'estradiol; les α-cétols avec deux groupes acétoxy et une fonction cétone ont une polarité voisine de celle des estriols. La 16-céto-estrone qui ne possède qu'un groupe acétoxy pour deux fonctions cétoniques devient le composé le plus polaire de la série. Dans ce système nous séparons l'estradiol-17β de son isomère 17α ainsi que les estriols cis des estriols trans. Par contre, les α-cétols ne peuvent être séparés entre eux.

En résumé, les estrogènes sont séparés en six fractions classées par ordre de polarité croissante :

1 - Estrone-17-désoxo

2 - Estradiol

3 - Estradiol-17α; estradiol-16α; estradiol-16β

4 - Estrone, estrone-16

5 - 16α-hydroxy-estrone; 16β-hydroxy-estrone; 16-céto-estradiol; estriol; 16,17-épi-estriol.

6 - 16-épi-estriol; 17-épi-estriol; 16-céto-estrone.

Nous avons obtenu de meilleures séparations sur chromatoplaques d'alumine (tableau XXVI). Malheureusement cet adsorbant présente quelques inconvénients. En effet, la révélation de faibles quantités est plus difficile à obtenir et il semble qu'il y ait une certaine désacétylation des dérivés.

TABLEAU XXVI

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE D'ALUMINE* DES ESTROGENES ACETYLES

STEROIDES	R_F	D S	n
Estrone	0,69	± 0,01	7
Estradiol-17β	0,80	± 0,02	7
Estradiol-17α	0,82	± 0,02	7
16α-hydroxy-estrone	0,61	± 0,02	7
16β-hydroxy-estrone	0,51	± 0,01	7
16-céto-estradiol	0,47	± 0,03	7
Estriol	0,69	± 0,02	7
16-épi-estriol	0,32	± 0,02	7
17-épi-estriol	0,44	± 0,03	7
16,17-épi-estriol	0,64	± 0,02	7

Couche mince d'alumine pour CCM Merck
Solvant : Chlorure de méthylène.

* La révélation par l'aldéhyde anisique doit se faire en deux fois pour obtenir un résultat satisfaisant. La plaque d'alumine est vaporisée avec le réactif, mise à sécher à 110°. On vaporise à nouveau le réactif sur la plaque. Les taches sont révélées après chauffage à 110°.

Avec ce système, la 16α-hydroxy-estrone est très nettement séparée de la 16β-hydroxy-estrone et du 16-céto-estradiol. Les quatre isomères de l'estriol sont bien séparés entre eux. Nous classons ainsi les estrogènes acétylés en cinq groupes:

1 - Estradiol; estradiol-17α
2 - Estrone; estriol
3 - 16,17-épi-estriol; 16α-hydroxy-estrone
4 - 16β-hydroxy-estrone; 16-céto-estradiol; 17-épi-estriol
5 - 16-épi-estriol.

Nous avons également étudié les dérivés acétylés sur chromatographie en couche mince de gel de silice silanizé. Dans le tableau suivant XXVII sont indiqués les R_F obtenus en utilisant le benzène comme solvant.

TABLEAU XXVII

CHROMATOGRAPHIE DES ACETATES D'ESTROGENES EN COUCHE MINCE DE GEL DE SILICE SILANIZE

STEROIDES	R_F*
17-désoxo-estrone	0,85
Estrone	0,21
Estrone-16	0,21
Estradiol-17β	0,40
Estradiol-16β	0,40
Estradiol-17α	0,37
Estradiol-16α	0,33
16α-hydroxy-estrone	0,18
16β-hydroxy-estrone	0,16
16-céto-estradiol	0,19
Estrone-16-céto	0,19
Estriol	0,13
Estriol-16-épi	0,16
Estriol-17-épi	0,10

Solvant : benzène

* Moyenne obtenue pour trois essais

Nous voyons que la silanization des sites actifs du gel de silice ne modifie pas l'ordre d'élution des estrogènes, ni même l'efficacité des séparations obtenues. Nous avions déjà constaté cela pour la séparation des estrogènes libres.

Etude des réactions colorées obtenues sur chromatographie en couche mince

Après migration des stéroïdes dans les systèmes décrits précédemment, les plaques de gel de silice sont séchées pendant 10 minutes à la température de la pièce, vaporisées avec le réactif fraîchement préparé puis placées pendant 10 ou 15 minutes dans une étuve à 110°. Les colorations obtenues sont observées immédiatement ou 24 heures plus tard. Pour l'essai de 24 heures, les plaques de gel de silice sont protégées par des plaques de verre. Les tableaux XXVIII à XXX montrent les colorations produites par différents réactifs.

1. Révélation avec l'aldéhyde anisique

Pour les composés libres, les résultats obtenus sont voisins de ceux décrits par LISBOA et DICZFALUSY [66]. Cependant ces auteurs n'avaient pas étudié le comportement de l'estrone-16, des estradiols-16β et 16α ainsi que celui de la plupart des dérivés 3-éthers-oxydes ou esters.

Le réactif à l'aldéhyde anisique permet d'obtenir des variations importantes de colorations avec les différents stéroïdes analysés. En particulier, il permet de reconnaître l'estrone de l'estrone-16 (gris olive et jaune) et l'estradiol-17β de ses épimères. Le groupe des estrogènes-α-cétoliques présente des colorations virant sur l'orange alors que celles des estriols tendent vers le bleu. A l'intérieur de ces groupes on observe quelques différences mais en l'absence de témoins elles sont assez difficiles à interpréter.

TABLEAU **XXVIII**

REACTIONS COLOREES DES ESTROGENES TRAITES PAR L'ALDEHYDE ANISIQUE APRES MIGRATION SUR PLAQUE DE GEL DE SILICE

Stéroïdes	Composés libres		Méthyl éthers		Méthyl éthers acétates		Acétates	
	10 mn.*	24 h*	10 mn.*	24 h*	10 mn.*	24 h*	10 mn.*	24 h*
17-désoxo-estrone	vert cl.	vert	vert ém.				vert ém.	vert ém.
estrone	gris ol.	olive	gris ol.	olive			gris bl.	olive
estrone-16	jaune	jaune	jaune	jaune			jaune	jaune
estradiol-17β	vert ém.	vert	bleu vt.	vert	vert ém.	vert	vert ém.	vert
estradiol-16β	bleu fon.	bleu vt.	bleu	bleu vt.	bleu mau.	bleu vt.	bleu mau.	bleu vt.
estradiol-17α	bleu fon.	bleu vt.	bleu	bleu vt.	bleu mau.	bleu vt.	bleu mau.	bleu vt.
estradiol-16α	mauve	bleu vt.	bleu	bleu vt.	bleu mau.	bleu vt.	mauve	bleu vt.
16α-hydroxy-estrone	rouge or.	rouge br.	rouge	rouge br.	rouge or.	rouge br.	rouge or.	rouge br.
16β-hydroxy-estrone	orange	jaune mar.						
16-céto-estradiol	orange	jaune mar.	orange	jaune mar.	orange	jaune mar.	orange	jaune mar.
16-céto-estrone	rose lilas	marron						
estriol	brun viol.	brun viol.	mauve	mauve	mauve	mauve	gris bl.	gris bl.
16-épi-estriol	bleu	bleu gris	bleu mau.	bleu mau.	bleu mau.	bleu mau.	gris bl.	gris bl.
17-épi-estriol	bleu	bleu gris	bleu mau.	bleu mau.	bleu mau.	bleu mau.	gris bl.	mauve
16,17-épi-estriol	bleu mau.	bleu vt.	bleu mau.	bleu mau.	bleu fon.	bleu fon.	gris bl.	gris bl.

* observé après 10 mn de chauffage ou 24 heures plus tard

Abréviations : cl. = clair ; ém. = émeraude ; bl. = bleu ; ol. = olive ; or. = orange ; br. = brun ; fon. = foncé
mau. = mauve ; mar. = marron ; vt. = vert

Préparation du réactif, cf. p. 73

TABLEAU **XXIX**

REACTIONS COLOREES DES ESTROGENES TRAITES PAR L'ACIDE SULFURIQUE APRES MIGRATION SUR PLAQUE DE GEL DE SILICE

Stéroïdes	composés libres		méthyl éthers		méthyl éthers acétates		acétates	
	15 mn.*	24 h*	15 mn.*	24 h*	15 mn.*	24 h*	15 mn.*	24 h*
17-désoxo-estrone	gris	gris perle	ter.de Si.	gris vert			ocre jau.	gris
estrone	rouge or.	rose	rouge or.	rose			jaune or.	rouge or.
estrone-16	jaune	jaune	jaune	jaune			jaune	jaune
estradiol-17β	rouge or.	rose	rouge or.	gris br.	ter.deSi.	gris mau.	jaune	jaune vert
estradiol-16β	rouge or.	mauve	rouge or.	gris vert	rouge br.	rouge mau.		jaune br.
estradiol-17α	rouge or.	rose rou.	rouge or.	gris br.	rouge br.	orange	jaune or.	mauve
estradiol-16α	rouge or.	rouge rose	rouge or.	gris vert	rouge br.	rouge mau.	jaune or.	rouge or.
16α-hydroxy-estrone	rouge	rouge	rouge or.	rouge mar.	rouge br.	rouge	jaune or.	mauve vert
16β-hydroxy-estrone	rouge or.	rose					ocre rou.	rouge or.
16-céto-estradiol	rouge or.	rose	rouge	marron	rouge	rouge	ocre rou.	rouge or.
17-céto-estrone	gris mau.	olive					gris or.	gris or.
estriol	gris or.	gris mau.	mauve	bleu gris	brun viol.	bleu mau.	gris or.	gris or.
16-épi-estriol	gris or.	rose mau.	brun rou.	bleu gris	mauve	bleu mau.	lilas fon.	vert ol.
17- épi-estriol	gris or.	rose mau.	brun rou.	bleu gris	violet	bleu mau.	lilas	lilas
16,17-épi-estriol	orange	violet			ter.de Si.	violet	lilas	vert

* observé immédiatement après 15 mn de chauffage ou 24 heures plus tard

Abréviations : br. = brun ; fon. = foncé ; jau. = jaune ; mar. = marron ; mau. = mauve ; ol. = olive ; or. = orange ; rou. = rouge ; viol. = violet ; ter. de Si. = terre de Sienne

Pour la préparation du réactif, cf. page 73

TABLEAU **XXX**

REACTIONS COLOREES DES ESTROGENES TRAITES PAR LE MELANGE ANHYDRIDE ACETIQUE-ACIDE SULFURIQUE APRES CCM

Stéroïdes	composés libres		méthyl éthers		acétates	
	15 mn.*	24 h*	15 mn.*	24 h*	15 mn.*	24 h*
17-désoxo-estrone	brun cl.	gris	ter.de Si.	gris bleu	jaune or.	gris bleu
estrone	rouge or.	rose fon.	rouge or.	brun	rouge or.	violet rose
estrone-16	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune
estradiol-17β	orange	rose fon.	jaune or.	brun	rouge br.	mauve
estradiol-16β	orange	mauve	rouge or.	vert br.	rouge br.	mauve
estradiol-17α	orange	rouge	rouge or.	brun	rouge br.	mauve
estradiol-16α	orange	mauve	rouge or.	vert br.	rouge br.	mauve
16α-hydroxy-estrone	rouge	rouge rose	orange	jaune br.	rouge br.	rose
16β-hydroxy-estrone	orange	orange	orange	orange	rouge or.	rouge br.
16-céto-estradiol	orange	orange	orange	orange	gris rose	gris ol .
16-céto-estrone	violet fon.	olive				
estriol	gris mau.	bleu mau.	mauve	mauve	gris mau.	gris bleu
16-épi-estriol	mauve	mauve	violet	mauve	gris bleu	gris bleu
17-épi-estriol	mauve	mauve	mauve	mauve	gris mau.	gris bleu
16,17-épi-estriol	orange	mauve	orange	mauve or.	violet rose	mauve

* observé immédiatement après chauffage ou 24 heures plus tard

Abréviations : cf. page 85

Préparation du réactif, cf. page 73

La formation de dérivés acétates ou 3-méthyl-éthers ne provoque pas de modification importante de la coloration du stéroïde.

2. Révélation par l'acide sulfurique

Les colorations produites par ce réactif avec les différents stéroïdes sont moins variées que celles produites par l'aldéhyde anisique, surtout immédiatement après chauffage. Après 24 heures à la température de la pièce, les colorations s'affinent et les nuances obtenues permettent d'identifier certains stéroïdes isomères. La difficulté de l'interprétation des couleurs exige dans la plupart des cas de disposer du témoin analytique. On peut identifier ainsi l'estradiol-17β et ses isomères 17α et 16β, la 16α-hydroxy-estrone de son isomère 16β; les estriols cis des estriols trans. L'estrone et l'estrone-16 ne peuvent être confondus; leurs colorations étant très différentes (rose et jaune). Les méthyl-éthers présentent après 24 heures des teintes plus grises que leurs analogues non méthylés.

3. Révélation par le mélange anhydride acétique-acide sulfurique

Les résultats obtenus avec ce réactif sont peu différents de ceux donnés par l'acide sulfurique. Les dérivés méthylés et acétylés présentent des colorations assez modifiées après 24 heures à la température ambiante. Par exemple les diols 3-méthyl-éthers dont la fonction alcool est en position 16 passent de la coloration rouge orange obtenue immédiatement après chauffage à la coloration verte brune après 24 heures. Les estradiols acétates passent du rouge brun au mauve. Avec ce réactif le 16,17-épi-estriol se distingue assez facilement des autres estriols tant sous sa forme libre qu'après formation de dérivés. La 16-céto-estrone présente

TABLEAU XXXI

COMPARAISON DE LA POLARITE DE QUELQUES ESTROGENES LIBRES, DE LEURS ACETATES ET DE LEURS 3-METHYL ETHERS (les estrogènes sont rangés dans l'ordre de leur polarité décroissante)

Estrogènes libres	3-méthyl éthers	Acétates	
Système 19	Système 21	Système 25	Système 26
Estriol-16α,17β	Estriol-16α,17β	16-céto-estrone	Estriol-16β,17β
Estriol-16β,17α	Estriol-16β,17α	Estriol-16α,17α	Estriol-16α,17α
Estriol-16β,17β	Estriol-16β,17β	Estriol-16β,17β	16-céto-estradiol
Estriol-16α,17α	Estriol-16α,17α	16-céto-estradiol	16β-hydroxy-estrone
16β-hydroxy-estrone	16β-hydroxy-estrone	16α-hydroxy-estrone	16α-hydroxy-estrone
16-céto-estradiol	16-céto-estradiol	Estriol-16β,17α	Estriol-16β,17α
16α-hydroxy-estrone	16α-hydroxy-estrone	16β-hydroxy-estrone	Estriol-16α,17β
Estradiol-17β	Estradiol-17β	Estriol-16α,17β	Estrone
Estradiol-17α	Estradiol-16α	Estrone	Estradiol-17β
16-céto-estrone	16-céto-estrone	Estradiol-17α	Estradiol-17α
Estrone	Estrone	Estradiol-17β	

Système 19 = gel de silice : benzène-acétate d'éthyle 6/4
Système 21 = gel de silice : benzène-acétate d'éthyle 8/2
Système 25 = gel de silice : benzène-acétate d'éthyle 9/1
Système 26 = alumine : chlorure de méthylène

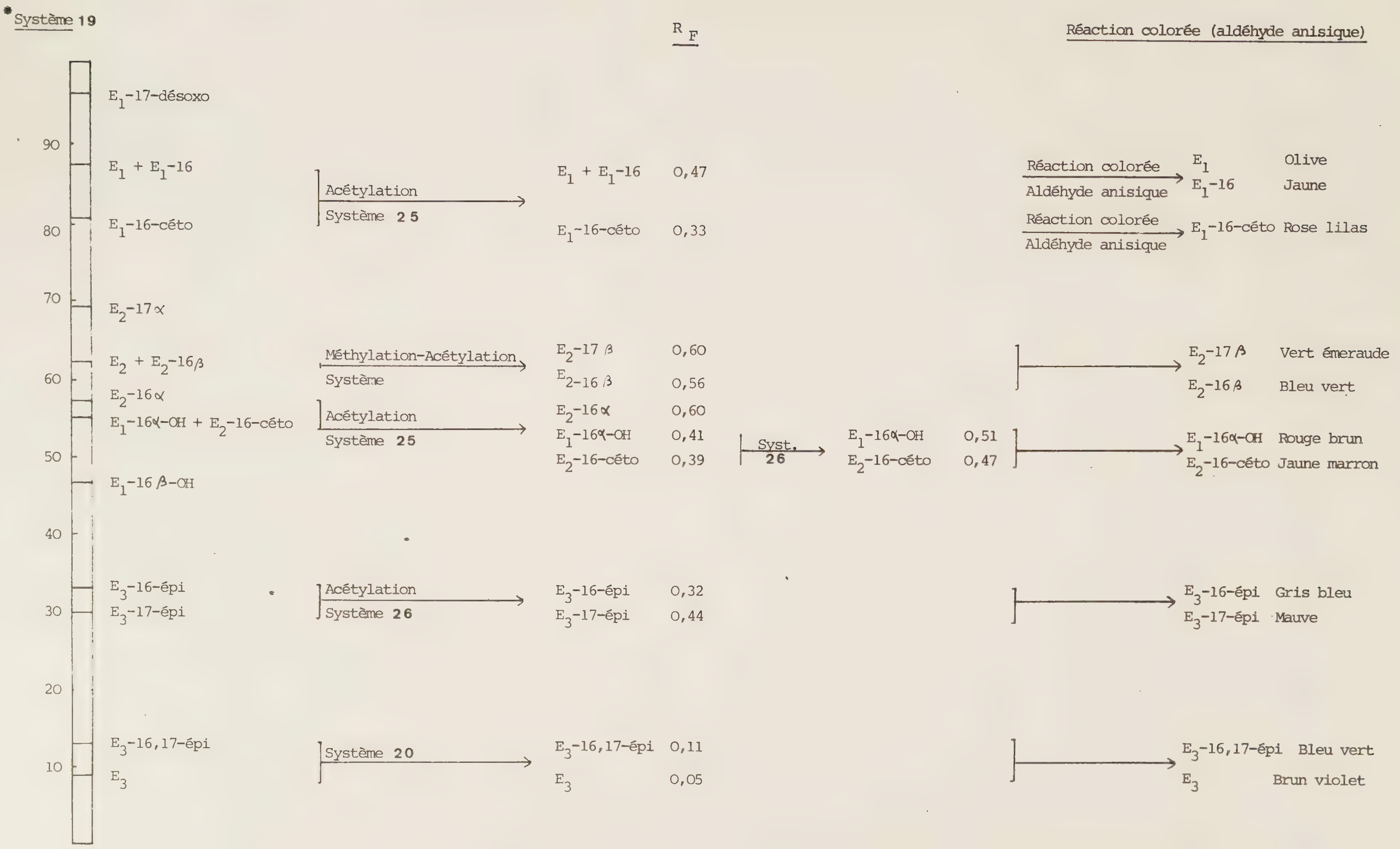


fig 3 Fractionnement et identification des estrogènes par C.C.M.

(* N° DES SYSTEMES = N° DES TABLEAUX DU TEXTE)

également une coloration très nettement différente des autres estrogènes étudiés.

En résumé, dans le tableau suivant XXXI , nous comparons l'ordre des migrations relatives des estrogènes libres, de leurs dérivés acétylés ou 3-méthyl-éthers, obtenus avec différents systèmes chromatographiques.

La figure 3 schématise un exemple de séparation et d'identification des estrogènes oxygénés en position 16 et 17. Un premier fractionnement des estrogènes libres est effectué en utilisant le mélange benzène-acétate d'éthyle 6:4 (système 19). Les composés migrant dans des zones voisines sont séparées (en général après acétylation) dans un deuxième système chromatographique. Les colorations obtenues après révélation à l'aldéhyde anisique et permettant d'identifier le stéroïde sont indiquées dans la partie droite de la figure 3

Discussion

Les estrogènes et leurs dérivés éther-oxydes ou esters présentent en chromatographie en couche mince un comportement identique à celui observé en chromatographie sur papier à fibres de verre. L'interprétation que l'on avait pu faire des résultats de ce dernier procédé (page 64) est également valable pour la chromatographie en couche mince. On peut noter cependant qu'il est nécéssaire d'utiliser des mélanges de solvants plus polaires pour faire migrer les estrogènes sur chromatoplaques de gel de silice ou d'alumine.

Nous avons pensé tout d'abord que la silanization des sites actifs de l'adsorbant, en supprimant son caractères hydrophile, allait modifier profondément son affinité pour les stéroïdes. Or les résultats obtenus avec cet adsorbant sont très voisins de ceux donnés par le gel de silice non traité (tableaux XIX et XX).

Parmi les estrogènes libres que nous avons chromatographiés, un certain nombre ont fait l'objet d'une étude similaire par LISBOA et DICZFALUSY [66]. Les résultats décrits par ces derniers montrent une séquence dans l'ordre d'élution des estrogènes, conforme à nos observations.

Nous avons étudié les colorations données par trois réactifs. Les résultats obtenus sont analogues à ceux décrits pour les estrogènes libres par LISBOA [76].

La coloration des dérivés méthylés ou acétylés présente peu de différence avec celle du composé libre.

Ces réactions colorées peuvent être très utiles pour compléter l'identification d'un composé.

Nous avons schématisé dans la figure 3 un exemple de procédé que l'on peut suivre pour fractionner et identifier les estrogènes oxygénés ou non en position 16 et 17. Cependant, dans les milieux biologiques, d'autres stéroïdes phénoliques ayant un comportement voisin en chromatographie en couche mince peuvent être présents. Il peut alors être nécessaire de les identifier et de les séparer.

Nous allons discuter quelques possibilités de la chromatographie en couche mince permettant de contribuer à la résolution de ces problèmes (figure 3) :

- Séparation et identification de l'estrone et de l'estrone-16.

L'estrone et l'estrone-16 peuvent être isolés des autres composés par chromatographie dans le système 19 (figure 3). Cependant nous n'avons pas pu séparer ces composés entre eux.

La présence d'une fonction cétonique voisine d'un groupe méthyl (estrone) peut être caractérisée par la réaction de ZIMMERMAN.

L'estrone et l'estrone-16 donnent également des colorations différentes après traitement avec l'aldéhyde anisique (tableau XXVIII).

L'estrone et la 2-méthoxy-estrone qui ont un comportement chromatographique voisin peuvent être séparés facilement avec le système C de LISBOA (voir page 95).

- Séparation et identification de l'estradiol et de ses isomères.

Dans ce groupe, seuls les estradiols-17β et 16β sont difficiles à séparer. Cependant leurs dérivés méthylés et acétylés ont des R_F différents dans le système 23 (figure 3).

L'estradiol-17β présente après traitement avec l'aldéhyde anisique une coloration vert émeraude très différente de celle donnée par les autres estradiols (bleue).

L'estradiol-16 α qui migre avec le groupe des α-cétols (système 19) est facilement séparé par chromatographie des dérivés acétylés. La révélation de ce composé par l'aldéhyde anisique produit une coloration bleu foncé alors que ce réactif donne avec les α-cétols des colorations oranges.

Un certain nombre d'autres estrogènes peuvent interférer en chromatographie en couche mince avec l'estradiol et ses isomères. Ce sont en particulier les 6,7 ou 11-céto-estrones, la 6 et la 9-déhydro-estrone ainsi que l'équilénine. Ces composés ne possèdant qu'une seule fonction acétylable, présenteront après estérification un comportement chromatographique différent des estradiols. Les systèmes C et O de LISBOA (voir ref 66) permettent également l'isolement de l'estradiol-17β et de son isomère -17α. Ces composés interférant, étant tous cétoniques, pourront être caractérisés par la réaction de ZIMMERMAN.

- Séparation et identification des estrogènes α-cétoliques.

Dans le système 19 , la 16β-hydroxy-estrone est bien séparée de la 16α-hydroxy-estrone et du 16-céto-estradiol qui migrent ensemble. Ces deux derniers seront isolés après acétylation par chromatographie en couche mince d'alumine avec le chlorure de méthylène comme éluant.

Les estrogènes α-cétoliques donnent une coloration orange à rouge lorsqu'ils sont traités par l'aldéhyde anisique. Cette coloration les distingue des autres estrogènes étudiés.

Certains phénolstéroïdes ont des caractéristiques chromatographiques voisines de celles des α-cétols. Ce sont en particulier la 6-déhydro-estrone, la 4-hydroxy-estrone, les 6, 7 et 11-céto-estrones. Ces composés ne possèdant qu'un hydroxyle (phénolique) présenteront un comportement chromatographique très différent de celui des α-cétols méthylés et acétylés.

LISBOA a proposé quelques systèmes permettant de séparer les α-cétols des 6 et 7-déhydro-estradiols ainsi que du 6-céto-estradiol.

- Séparation et identification de l'estriol et de ses isomères.

Il est assez facile de séparer par chromatographie en couche mince les estriols des autres estrogènes étudiés, et eux-mêmes en deux groupes : d'une part, l'estriol et son isomère 16,17-épi et d'autre part, l'estriol-16-épi et l'estriol-17-épi. L'estriol et l'estriol-16,17-épi peuvent se séparer dans les systèmes 19 ou 20 (page 76); par contre, les estriols-16-épi et 17-épi ne peuvent être séparés qu'après acétylation par chromatographie et sur plaque d'alumine. La formation de dérivés acétylés a en plus l'avantage d'inverser totalement l'ordre d'élution des estriols, ce qui peut être un moyen supplémentaire d'identification.

Traités par l'aldéhyde anisique les estriols ont des colorations allant du bleu au mauve. Dans la série des estrogènes étudiés par nous, seuls les isomères de l'estradiol présentent des colorations analogues. Ces deux groupes se distinguent cependant après traitement par l'acide sulfurique. Les quatre estriols montrent entre eux des différences de couleurs avec les trois réactifs étudiés. Cependant l'interprétation de ces différences est assez délicate et il est nécéssaire de disposer d'un témoin.

Le 16,17-épi-estriol traité par l'anhydride acétique a une coloration orange caractéristique. Il peut être nécéssaire d'avoir à séparer les estriols des autres estrogènes de comportement chromatographique voisin. Dans le système A de LISBOA, nous voyons que le 16-épi-estriol et le 17-épi-estriol ont des R_F voisins de celui des 6α, 6β, 7α, 7β et 15α-hydroxy-estrones ainsi que du 7-céto-estradiol et des 2 , 6α, 6β, 7α-hydroxy-estradiols.

Le tableau XXXII indique les différents procédés que l'on peut utiliser pour séparer et identifier ces composés.

TABLEAU XXXII

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU 16-EPI ET DU 17-EPI-ESTRIOL PAR RAPPORT AUX ESTROGENES AYANT UN COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE ANALOGUE.

STEROIDES	Réaction de Zimmerman	Acétylation*	Systèmes C.C.M. de LISBOA (66)		
			C**	D**	E**
16-épi-estriol	-	3	0,18	0,26	0,54
17-épi-estriol	-	3	0,20	0,30	0,58
6α-hydroxy-estrone	+	2	0,13		
6β-hydroxy-estrone	+	2	0,12		
7α-hydroxy-estrone	+	2	0,12		
7β-hydroxy-estrone	+	2			
15α-hydroxy-estrone	-	2		0,46	
7-céto-estradiol	-	2		0,41	
2-hydroxy-estradiol	-	3			0,70
6α-hydroxy-estradiol	-	3	0,12		
6β-hydroxy-estradiol	-	3	0,12		
7α-hydroxy-estradiol	-	3	0,09		

* Dans cette colonne, le nombre de groupes alcools susceptibles d'être acétylés est indiqué.

** (C = acétate d'éthyle 50 - cyclo-hexane 50 v/v
(D = chloroforme 90 - éthanol 10 v/v
(E = acétate d'éthyle 72 - n-hexane 13,5 - acide acétique 10 - éthanol 4,5 v/v.

Les estrogènes dont la migration en chromatographie en couche mince est susceptible d'interférer avec celle de l'estriol ou celle du 16,17-épi-estriol sont : le 15α-hydroxy-estradiol, le 11β-hydroxy-estradiol et le 2-méthoxy-estriol. Ces composés peuvent être séparés des estriols par chromatographie en couche mince dans les systèmes D et E de LISBOA (66) comme le montre le tableau suivant :

TABLEAU XXXIII

SEPARATION DU 16,17-EPI-ESTRIOL ET DE L'ESTRIOL DES ESTROGENES DE COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE SIMILAIRE.

STEROIDES	Système de chromatographie (66)		
	A	D	E
Estriol	0,29	0,21	0,50
16,17-épi-estriol	0,34	0,18	
15α-hydroxy-estradiol	0,26	0,16	0,38
11β-hydroxy-estradiol	0,34	0,29	
2-méthoxy-estriol	0,29		0,43

A = acétate d'éthyle 45 - cyclo-hexane 45 - éthanol 10 (v/v)

D = chloroforme 90 - éthanol 10 (v/v)

E = acétate d'éthyle 72 - n-hexane 13,5 - acide acétique 10 - éthanol 4,5 (v/v)

- Séparation et identification de la 16-céto-estrone.

La 16-céto-estrone a, en chromatographie en couche mince, une polarité voisine de celle de l'estrone. Cependant ces deux composés peuvent être fractionnés dans le système 25 (figure 3).

Traité par l'aldéhyde anisique, la 16-céto-estrone présente une coloration caractéristique rose lilas, tournant au marron après 24 heures. Elle se distingue ainsi de tous les autres estrogènes phénoliques. La 9-déhydro-estrone et la 2-méthoxy-estrone ont une polarité voisine de celle de la 16-céto-estrone. LISBOA (66) a proposé un système permettant un certain isolement de cette dernière.

CONCLUSION

Nous avons utilisé un certain nombre de procédés qui nous ont permis de purifier et d'identifier les phénolstéroïdes par chromatographie en couche mince. Les possibilités d'identification de la chromatographie en couche mince ont été augmentées par l'emploi de réactifs colorés.

La méthylation sélective de l'hydroxyle phénolique ainsi que l'acétylation des groupements alcools, en modifiant la polarité, ont permis d'obtenir la séparation et l'identification de certains composés, objectif qui n'avait pu être réalisé avec les composés libres.

III) CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La séparation des stéroïdes par chromatographie gaz-liquide est fondée sur les mêmes règles que celles qui régissent la chromatographie de partage. Dans ce système la phase stationnaire est constituée par un support solide inerte d'une granulométrie fine imprégnée sur sa surface d'un film liquide. La phase mobile ou phase gazeuse est un mélange de gaz vecteur et de soluté. L'énergie libre de dissolution du stéroïde étudié, dans une phase liquide donnée, dans des conditions déterminées, est traduite par le temps de rétention observé entre le moment de l'introduction de l'échantillon en tête de la colonne et sa détection à la sortie. Le temps de rétention ainsi observé est caractéristique du stéroïde étudié. Il peut être utilisé soit directement (TR), soit relativement à un standard donné (temps de rétention relatif, TRR).

La sortie du soluté de la colonne chromatographique est détectée selon différents procédés. Dans le domaine des stéroïdes les systèmes les plus utilisés sont le détecteur à ionisation de flamme et le détecteur à capture d'électrons.

Le détecteur à ionisation de flamme utilise la propriété des substances organiques de donner des ions par combustion; ce qui permet la formation d'un courant électrique. Il est préférable d'employer ce système pour l'analyse de quantités de substances supérieures à 10 nanogrammes. Avec ce détecteur d'un usage général et simple, on obtient des réponses linéaires dans un intervalle étendu.

L'emploi du détecteur à capture d'électrons s'impose lorsqu'il s'agit de doser des quantités de substances inférieures à 10 nanogrammes. Ce procédé est basé sur l'affinité électronique de certains composés. Il nécessite une source d'électrons primaires qui, réagissant avec les molécules du gaz-porteur, ionisera celles-ci. Dans des conditions stables, la cellule du détecteur disposera d'une concentration constante d'ions positifs et d'électrons. Si l'on applique un potentiel aux deux électrodes de la cellule, un courant s'établira. Lorsqu'au gaz-porteur se trouvera mélangée une substance accepteur d'électrons, celle-ci captera ces électrons, prendra une charge négative qui tendra à se combiner aux ions positifs. Cela se traduira par une chute de potentiel aux bornes des électrodes. Cette chute est proportionnelle à l'affinité électronique de ce composé et à sa concentration. La source ionisante est en général une feuille d'acier recouverte de titane tritié ou de nickel^{63}.

Si ce détecteur est nettement plus sensible (limite inférieure voisine du picogramme) il est d'un emploi plus délicat et sa gamme de linéarité de réponse est faible (environ cent fois). De plus, la sensibilité de la réponse de l'appareil est fonction du composé étudié; ce qui nécessite pour l'étude des stéroïdes la préparation de dérivés ayant une forte affinité pour les électrons.

Les facteurs propres aux composés étudiés affectant le temps de rétention sont : le poids moléculaire, la volatilité, la polarité, la forme de la molécule, les empêchements stériques, les interactions intra-moléculaires, l'affinité spécifique de certaines fonctions pour certaines phases stationnaires. Ces facteurs peuvent agir scit

dans le même sens, soit dans un sens opposé; exemple : l'acétylation augmente le poids moléculaire mais diminue la polarité.

Le concept de MARTIN [25] concernant la chromatographie sur papier a été appliqué par plusieurs auteurs pour l'interprétation du comportement des stéroïdes. C'est ainsi que pour CLAYTON [87], l'introduction d'un substituant sur une position particulière du noyau stéroïdique modifie le temps de rétention (TR) de la molécule entière par une constante dépendante de la nature chimique du groupe introduit, de sa position et de sa configuration stéréochimique. Ce facteur est indépendant du poids moléculaire, de la structure et de l'influence des autres substituants avec lesquels il n'est pas en interaction. CLAYTON suggère que le temps de rétention d'un stéroïde polysubstitué dans lequel les interactions des groupes intra-moléculaires sont négligeables peut être exprimé par l'équation :

$$r(n + a + b + c + \dots) = rn \times Ka \times Kb \times Kc \times \dots$$

équation dans laquelle rn est le TR du noyau non substitué.

Ka, Kb,... sont les facteurs de rétention des groupes en position a, b, ... du noyau.

KNIGTS et THOMAS [88] ont utilisé l'équation de CLAYTON sous sa forme logarithmique. Le mode de calcul du facteur de séparation a été décrit par HARTMAN et WOTIZ [89].

Dans les structures polycycliques comme celles que l'on rencontre dans les stéroïdes, l'importance des facteurs stériques est plus grande et les écarts par rapport aux valeurs théoriques peuvent être notables. Cependant la rigidité du noyau stéroïdique présente peu de possibilités d'inversion conformationnelle, ce qui

limite le nombre d'informations obtenues sur chaque stéroïde.

Avec une phase "non sélective", le poids moléculaire du stéroïde est le principal facteur contribuant au temps de rétention. L'incrément apporté par l'addition d'une fonction oxygénée ne diffère pas considérablement de celui que donne un carbone. C'est ainsi que VAN DEN HEUVEL et HORNING (90) ont suggéré l'emploi des indices de stéroïdes (SN), paramètres dérivant de l'indice de carbone de WOODFORD et VAN GENT (91), afin d'établir la relation entre la structure du stéroïde et son temps de rétention, observé en chromatographie gazeuse.

Le "nombre stéroïdique" représente la somme des termes dépendant de la nature du squelette carboné et des groupes fonctionnels fixés sur la molécule de stéroïde.

$$SN = S + Fa + Fb + \dots$$

où : SN = nombre stéroïdique,
S = contenu carboné du squelette stéroïdique,
Fa, Fb = valeurs caractéristiques des groupes fonctionnels.

La valeur "SN" est obtenue en comparant, dans les mêmes conditions, le temps de rétention du stéroïde avec celui du cholestane (SN = 27) et de l'androstane (SN = 19).

Ces mêmes auteurs (90) ont proposé un autre paramètre, l'indice T obtenu en comparant les rétentions relatives du stéroïde sur deux phases stationnaires différentes. Ce paramètre dépend aussi du degré de sélectivité de la phase stationnaire.

Cet indice T est déterminé selon l'équation :

$$T = \frac{t's - t'n}{t'n}$$

t's = TRR observé sur une phase polaire
t'n = TRR observé sur une phase non polaire.

L'indice T permet d'obtenir des informations sur le nombre, la nature et les relations stéréochimiques des groupes fonctionnels.

La première démonstration pratique de séparation des stéroïdes par chromatographie en phase gazeuse a été décrite par VAN DEN HEUVEL, SWEELEY et HORNING [92] en 1960. En 1961, WOTIZ et MARTIN [93] ont étudié les trois principaux estrogènes urinaires en chromatographie gazeuse sous la forme de dérivés acétylés.

On a peu étudié les estrogènes sous leur forme libre en raison de l'absorption importante de ces substances sur les colonnes, des faibles séparations obtenues et des risques de décomposition de certains stéroïdes. Afin de pallier ces inconvénients, un certain nombre de dérivés des fonctions alcools et cétones ont été préparés. Les principaux dérivés utilisés pour l'étude des stéroïdes phénoliques ont été : les méthyl-éthers pour l'hydroxyle phénolique [94], les acétates [95] et les triméthylsilyl-éthers pour l'ensemble des hydroxyles présents dans la molécule. En 1965, nous avons décrit le fractionnement par chromatographie gazeuse d'une trentaine de dérivés méthylés ou acétylés des estrogènes [96].

Nous avons montré avec CONDOM et EMILIOZZI [97] que les glucuronides de stéroïdes pouvaient être chromatographiés sous forme de dérivés méthylés et acétylés. VAN DEN HEUVEL [98] a

étudié ces mêmes composés sous forme de triméthylsilyl-éthers.

Comme nous l'avons vu précédemment, la sensibilité du détecteur à capture d'électrons dépend de l'affinité électronique des composés étudiés. Peu de stéroïdes ayant cette capacité , de nombreux dérivés halogénés ont été synthétisés. Parmi les dérivés les plus fréquemment utilisés il faut noter les monochloracétates [100-101] et surtout les heptafluorobutyrates [102]. La pentafluorophényl-hydrazone a été proposée [103] comme dérivé de la fonction cétone. Avec RADO, nous avons décrit la synthèse et le comportement chromatographique d'un certain nombre de ces dérivés [104].

L'emploi du détecteur au nickel ^{63} permettant de travailler à des températures élevées limite les contraintes imposées par la température relativement basse exigée pour la conservation du détecteur au tritium. Il permet l'étude de dérivés moins volatils.

Cependant, parmi les dérivés proposés pour la capture d'électrons, nombreux sont ceux dont la synthèse est délicate et la stabilité faible (en particulier les dérivés de la fonction phénolique). C'est pour cela que certains auteurs ont bloqué au préalable cette fonction par la formation d'un dérivé méthyl-éther.

Si les différents dérivés utilisés jusqu'à présent offrent de bons caractères chromatographiques, l'apparition d'un pic fin et symétrique n'assure pas qu'un seul composé soit responsable de ce pic. On doit donc faire une étude comparative avec plusieurs phases stationnaires.

- les phases dites "sélectives" telles que : le QF I (Fluoroalkylsiloxane-polymère), le N.G.S. (Néopentylglycolsuccinate),

le XE 60 (Cyanoéthylméthyl-siloxane-polymère) et l'OV 17 (Méthyl-phénylsiloxane-polymère);

- les phases "non sélectives" telles que le SE 30, l'OV I (Méthyl-siloxane-polymère).

Les phases "sélectives" ou "polaires" séparent les stéroïdes en fonction de la nature, du nombre, de la position et de la situation stérique des groupes fonctionnels portés par la molécule. Les phases "non sélectives" séparent les stéroïdes en fonction surtout de leur poids moléculaire et de la forme de la molécule.

Depuis la première application pratique de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des stéroïdes en milieu biologique [92], un nombre important de méthodes a été proposé. Cette multiplication même des méthodes est la preuve de la difficulté à mettre au point une technique simple, rapide, précise et sûre. S'il est relativement facile de doser l'estrone et l'estriol dans l'urine de femme enceinte, étant donné l'abondance de ces stéroïdes, le problème devient plus difficile lorsqu'il s'agit de doser des quantités notablement plus faibles d'estrogènes (par exemple dans le plasma). Dans ces conditions, il est nécessaire de procéder à un certain nombre de purifications préliminaires.

Dans le travail que nous allons décrire, nous avons étudié systématiquement le comportement en chromatographie gazeuse d'un certain nombre de stéroïdes phénoliques avec ou sans fonctions oxygénées en position 16 ou 17. Cette étude a été effectuée sur les stéroïdes de base, leurs dérivés méthylés et acétylés. Nous avons également étudié quelques dérivés de phénolstéroïdes ayant une

affinité pour les électrons. Ce sont les monochloracétates, les perfluorooctanoates et les pentafluorophénylhydrazones. Nous avons utilisé pour cela cinq phases stationnaires différentes dont trois "polaires" (QF1, XE 60, OV 17) et deux "non polaires" (SE 30 et OV 1). Les résultats obtenus ont été étudiés sous différents aspects : séparation, incréments fonctionnels et sensibilité.

En résumé, ce travail comportera les parties suivantes :

A) - Chromatographie en phase gazeuse des estrogènes et de leurs dérivés acétylés, méthylés ou méthylés et acétylés.

1) a - Séparation des estrogènes sur colonnes non polaires
   b - Séparation des estrogènes sur colonnes polaires

2) "Nombres stéroïdiques" des estrogènes et de leurs dérivés

3) Discussion.

B) - Etude de dérivés des estrogènes ayant une affinité pour les électrons.

a) Fractionnement des dérivés monochloracétylés ou pentafluorophénylhydrazones.

b) Fractionnement des dérivés perfluorooctanoates des estrogènes.

c) Etude de la sensibilité et de la linéarité des réponses des détecteurs vis-à-vis de ces dérivés.

d) Discussion.

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

Appareils utilisés

o Barber Colman, modèle 10 avec détecteur à ionisation (cellule A 4140 - ^{90}Sr) utilisant l'argon,

o Aérograph modèle 600 D avec stabilisateur de température, modèle 328 et détecteur à ionisation de flamme,

o F et M, modèle 402 avec détecteur à ionisation de flamme et détecteur à capture d'électrons au nickel^{63},

o Aérograph modèle 1200 avec détecteur à capture d'électrons au tritium.

Colonnes

- Les colonnes en verre sont silanizées avant emploi en les laissant une nuit en contact avec une solution à 5 % de diméthyl-dichlorosilane dans le toluène, puis lavées avec du toluène, du méthanol et séchées.

La laine de verre est traitée de la même façon.

- Le support utilisé dans la majorité des cas est le "gas Chrom Q" de 80 à 100 mesh. Il est repris par de l'alcool absolu et les particules en suspension sont éliminées. On recommence cette opération deux ou trois fois puis on sèche le gas Chrom Q à l'étuve à 100°.

- La phase stationnaire est déposée sur le support selon la méthode de HORNING [105].

- Les colonnes dites "polaires" sont conditionnées 48 heures à 250°, excepté pour la colonne "OV 17" qui est chauffée à 320°, dans un courant d'azote.

- La migration des stéroïdes est définie par le temps de rétention rapporté à celui de l'estrone acétate, qui est utilisé comme standard de référence à chaque opération.

- Les stéroïdes sont en solution dans l'alcool absolu à la concentration de 1 mg par ml.

- Les volumes injectés sont de l'ordre de 1 µl.

- Pour les dérivés étudiés avec détecteur à capture d'électrons, le solvant utilisé est soit le benzène soit l'hexane. Les concentrations et les volumes injectés sont variables.

Résultats

A) Chromatographie en phase gazeuse des estrogènes, de leurs dérivés méthylés ou acétylés ou méthylés et acétylés.

1 - a) Chromatographie des estrogènes sur colonnes "non polaires"

- Résultats obtenus avec une colonne "OV 1"

TABLEAU XXXIV

CHROMATOGRAPHIE DES ESTROGENES SUR OV 1 (4%)
(temps de rétention par rapport à celui de l'acétate d'estrone)

Composés	Libres	3-méthyl-éthers	3-méthyl éthers acétates	Acétates
17-désoxo-estrone	0,44	0,40		0,56
Estrone	0,79	0,68		1
Estrone-16	0,77	0,68		1
Estradiol-17β	0,78	0,70	1	1,39
Estradiol-16β	0,77	0,70	1	1,34
Estradiol-17α	0,77	0,70	0,92	1,34
Estradiol-16α	0,77	0,70	0,91	1,37
16α-hydroxy-estrone	1,05	0,94	1,38	1,97
16β-hydroxy-estrone	1,05		1,41	2,01
16-céto-estradiol	1,05	0,98	1,44	2,10
16-céto-estrone	1,18	1,02		1,50
Estriol	1,36	1,22	1,71	2,46
16-épi-estriol	1,36	1,22	1,98	2,92
17-épi-estriol			1,88	2,75
16,17-épi-estriol	1,36	1,22	1,75	2,60

(temps de rétention de l'acétate-estrone = 5,5 mn)

(Appareil F et M 402 - Colonne de verre de 3 m sur 4 mm.
Température du four = 260°)

(Injecteur 280°, détecteur 310°, débit de l'azote 44 ml/mn).

Les estrogènes libres peuvent être chromatographiés sur cette colonne à l'exception du 17-épi-estriol qui se décompose partiellement. Cependant les séparations obtenues ne sont pas excellentes, cette phase stationnaire ne permettant pas de différencier les fonctions alcools et les fonctions cétones.
Le tableau XXXIV nous montre les séparations obtenues avec les différents estrogènes et dérivés étudiés. Nous voyons que la méthylation de l'hydroxyle phénolique diminue le temps de rétention, mais non le comportement relatif des estrogènes.

- les estrogènes libres et méthylés sont séparés en cinq fractions (selon un temps de retention croissant) :

1. 17-désoxo-estrone
2. Estrone; estrone-16; estradiols-17β,-17α,-16β,-16α
3. 16α-hydroxy-estrone; 16β-hydroxy-estrone; 16-céto-estradiol
4. 16-céto-estrone
5. Estriols-16α, 17β; 16α,17α; 16β,17β; 16β,17α.

- les estrogènes acétylés sont séparés en sept fractions :

1. 17-désoxo-estrone
2. Estrone-16 et estrone-17
3. Estradiols-17β, -17α, -16β, -16α
4. 16-céto-estrone
5. 16α-hydroxy-estrone; 16β-hydroxy-estrone
6. 16-céto-estradiol
7. Estriols-16α,17β; 16β,17α; 16β,17β, 16α,17α.

A l'intérieur du groupe 7, nous séparons les différents estriols entre eux. L'acétylation, en augmentant la différence de poids entre l'estrone et l'estradiol permet de les séparer. Il en est de même de la 16-céto-estrone qui ne comporte qu'un seul acétate et se différencie ainsi du groupe des estrogènes α-cétoliques.

- Résultats obtenus avec une colonne de "SE 30"

Les résultats décrits sur le tableau XXXV montrent que les temps de rétention relatifs obtenus avec le "SE 30" sont très voisins de ceux donnés par "l'OV 1". Cependant les dérivés acétylés ont un temps de rétention plus important avec le "SE 30". Il est supérieur à 10 % pour les acétates des α-cétols et des isomères de l'estriol.

TABLEAU XXXV

CHROMATOGRAPHIE DES ESTROGENES SUR SE 30 (3%)

(temps de rétention par rapport à celui de l'acétate d'estrone).

Composés	Libres	3-méthyl éthers	3-méthyl éthers acétates	Acétates
17-désoxo-estrone	0,43	0,37		0,56
Estrone	0,74	0,66		1,00
Estrone-16	0,75	0,66		1,00
Estradiol-17β	0,81	0,71	0,96	1,44
Estradiol-16β	0,78	0,69	0,97	1,46
Estradiol-17α	0,79	0,71	0,93	1,46
Estradiol-16α	0,76	0,70	0,93	1,46
16α-hydroxy-estrone	1,05	0,92	1,41	2,20
16β-hydroxy-estrone	1,05	0,93	1,47	2,23
16-céto-estradiol	1,05	0,91	1,47	2,27
16-céto-estrone	1,20	1,02		1,56
Estriol	1,40	1,23	1,86	2,87
16-épiestriol	1,44	1,26	2,15	3,34
17-épi-estriol	1,44	1,27	2,01	3,14
16,17-épi-estriol	1,40	1,25	1,96	3,01

(Temps de rétention de l'acétate d'estrone = 17,75 mn)

(Aérograph modèle 600 D avec stabilisateur de température 328)

(Colonne de verre de 10 m sur 2 mm
température du four = 235°; de l'injecteur = 265°)

Le débit de l'azote est de 40 ml par minute.

1 - b) Chromatographie des estrogènes sur colonnes "polaires"

- Résultats obtenus avec une colonne d'"OV 17"

TABLEAU XXXVI

CHROMATOGRAPHIE DES ESTROGENES SUR OV 17 (3%)

(temps de rétention par rapport à celui de l'acétate d'estrone)

Composés	Libres	3-méthyl éthers	3-méthyl éthers acétates	Acétates
17-désoxo-estrone	0,30	0,23		0,37
Estrone	0,79	0,60		1,00
Estrone-16	0,81	0,59		1,00
Estradiol-17β	0,78	0,58	0,76	1,26
Estradiol-16β	0,78	0,54	0,77	1,27
Estradiol-17α	0,77	0,56	0,73	1,22
Estradiol-16α	0,76	0,55	0,73	1,25
16α-hydroxy-estrone	1,22	0,93	1,53	2,59
16β-hydroxy-estrone	1,23	0,93	1,56	2,59
16-céto-estradiol	1,24	0,93	1,61	2,73
16-céto-estrone	1,65	1,21		2,06
Estriol	1,70	1,29	1,71	2,91
16-épi-estriol	1,70	1,33	1,96	3,30
17-épi-estriol	1,72	1,34	1,91	3,22
16,17-épi-estriol	1,70	1,30	1,72	2,90

(Temps de rétention de l'acétate d'estrone = 14,08 mn)
(Appareil F et M 402 - Colonne de verre de 3 m sur 4 mm.
température du four : 260°, du détecteur : 310°,
de l'injecteur : 280°.
Le débit de l'azote est de 44 ml/mn.

Avec l'"OV 17" (tableau XXXVI), tous les composés libres sont chromatographiés sans décomposition. L'estrone et l'estradiol doivent être acétylés pour pouvoir être séparés. Cette phase ne semble pas non plus très efficace pour séparer les différents isomères entre eux. La diminution du temps de rétention apportée par la méthylation est plus importante qu'avec les phases moins polaires comme l'OV 1 ou le SE 30 (20 à 25 % au lieu de 10 % environ).

- Résultats obtenus avec une colonne de "XE 60"

TABLEAU XXXVII
CHROMATOGRAPHIE DES ESTROGENES SUR XE 60 (3%)
(temps de rétention par rapport à celui de l'acétate d'estrone)

Composés	Libres	3-méthyl éthers	3-méthyl éthers acétates	Acétates
17-désoxo-estrone	0,30	0,16		0,30
Estrone	1,02	0,47		1,00
Estrone-16	1,07	0,50		1,10
Estradiol-17β	0,90	0,45	0,51	1,05
Estradiol-16β	0,87	0,45	0,53	1,07
Estradiol-17α	0,84	0,44	0,51	0,98
Estradiol-16α	0,89	0,44	0,49	1,00
16α-hydroxy-estrone		0,82	1,17	2,67
16β-hydroxy-estrone		0,81	1,25	2,94
16-céto-estradiol		0,81	1,46	3,20
16-céto-estrone		1,32		
Estriol		1,24	1,17	2,40
16-épi-estriol			1,62	3,45
17-épi-estriol			1,48	3,06
16,17-épi-estriol		1,30	1,29	2,61

(Temps de rétention de l'acétate d'estrone = 13,73 mn)

(Aérograph modèle 600 D avec stabilisateur de température modèle 328)

(Colonne de verre de 3 m sur 2 mm. Température du four = 240°, de l'injecteur = 265°.)

(Débit de l'azote : 40 ml par minute).

Chromatographiés sur XE 60, les estrogènes possèdant plus de deux fonctions cétoliques ou hydroxyles sont soit très fortement adsorbés, soit décomposés. En effet nous n'avons pu obtenir de pic pour les estrogènes α-cétoliques et les isomères de l'estriol. La méthylation de l'hydroxyle phénolique améliore le comportement de ces composés en diminuant leur polarité.

Les estrogènes libres ou méthylés sont séparés en cinq fractions (selon un TR croissant) :

1. 17-désoxo-estrone
2. Estradiols-17β, -17α, -16β, -16α
3. Estrone; estrone-16
4. 16α-hydroxy-estrone; 16β-hydroxy-estrone; 16-céto-estradiol
5. 16-céto-estrone; estriols-16α,17β; 16β,17α; 16β,17β.

Les estrogènes acétylés sont séparés en huit fractions :

1. 17-désoxo-estrone
2. Estrone; estradiol-17α; estradiol-16α
3. Estrone-16; estradiol-17β; estradiol-16β
4. Estriol-16α,17β
5. Estriol-16,17-épi; 16α-hydroxy-estrone
6. 17-épi-estriol; 16β-hydroxy-estrone
7. 16-céto-estradiol
8. 16-épi-estriol.

Nous voyons que les deux isomères de l'estrone ne peuvent être séparés des isomères de l'estradiol que sous leur forme libre ou 3-méthyl-éther. L'acétylation permet d'améliorer la séparation entre l'estrone et l'estrone-16 et de séparer l'estradiol de l'estradiol-17α. Les acétates des quatre estriols isomères sont bien séparés entre eux, ainsi que celui du 16-céto-estradiol de ceux des épimères 16 ξ -hydroxy-estrone. Par contre les acétates d'α-cétols et des isomères de l'estriol ont des temps de rétention voisins et il faut séparer les stéroïdes de ces deux groupes sous forme de dérivés 3-méthyl-éthers. Il est important de noter qu'avec cette phase stationnaire l'acétylation ne modifie sensiblement pas le temps de rétention. Les modifications du T R qui sont dûes à l'augmentation du poids moléculaire et à la diminution de la polarité se font chacune dans un sens opposé et sont de même importance.

- Résultats obtenus avec une colonne de "QF 1"

TABLEAU XXXVIII

CHROMATOGRAPHIE DES ESTROGENES SUR QF 1 (2%)

(Temps de rétention par rapport à celui de l'acétate d'estrone)

Composés	Libres	3-méthyl éthers	3-méthyl éthers acétates	Acétates
17-désoxo-estrone	0,19	0,15		0,30
Estrone	0,59	0,45		1,00
Estrone-16	0,59	0,45		1,08
Estradiol-17β	0,40	0,32	0,46	1,00
Estradiol-16β	0,40	0,32	0,49	1,07
Estradiol-17α	0,39	0,30	0,44	0,99
Estradiol-16α	0,41	0,32	0,45	1,00
16α-hydroxy-estrone	0,79	0,59	0,98	2,36
16β-hydroxy-estrone	0,79	0,59	1,10	2,57
16-céto-estradiol	0,79	0,59	1,16	2,84
16-céto-estrone	1,79	1,20		2,83
Estriol	0,80	0,59	1,00	2,26
16-épi-estriol		0,59	1,42	3,34
17-épi-estriol		0,59	1,31	3,08
16,17-épi-estriol	0,80	0,59	1,10	2,56

(Temps de rétention de l'acétate d'estrone : 10,24 mn)

(F et M modèle 402 - Colonne de verre de 3 m sur 4 mm - température du four = 248°, du détecteur = 280°)

Débit de l'azote = 44 ml/mn.

Les estrogènes libres peuvent être chromatographiés sur cette colonne de QF 1, à l'exception des deux isomères cis de l'estriol qui se décomposent partiellement. La séparation entre l'estrone et l'estradiol libre est encore plus nette sur QF 1 que sur XE 60. Les acétates d'α-cétols et d'estriols migrent à une vitesse voisine, ce qui rend difficile l'identification de certains de ces composés lorsqu'ils sont chromatographiés ensemble. La 16-céto-estrone libre

ou méthylée est isolée des estriols, ce qui n'est pas le cas sur le XE 60. Le temps de rétention relativement élevé de la 16-céto-estrone met en évidence l'affinité du QF 1 pour les fonctions cétoniques.

Les estrogènes ou leurs dérivés méthyl-éthers sont séparés en six fractions (selon le T R croissant) :

1. 17-désoxo-estrone
2. Estradiols-17β, -17α, -16β, 16α
3. Estrone; estrone-16
4. 16α-hydroxy-estrone; 16β-hydroxy-estrone; 16-céto-estradiol
5. Estriols-16α,17β; 16β,17α; 16β,17β; 16α,17α
6. 16-céto-estrone.

Les estrogènes acétylés sont séparés en sept fractions :

1. 17-désoxo-estrone
2. Les isomères de l'estrone et de l'estradiol
3. 16α-hydroxy-estrone et estriol
4. 16β-hydroxy-estradiol et 16,17-épi-estriol
5. 16-céto-estradiol; 16-céto-estrone
6. 17-épi-estriol
7. 16-épi-estriol.

A l'intérieur du groupe 2, nous séparons l'estrone de l'estrone-16. Nous obtenons également deux pics pour l'estradiol et l'estradiol-16β mais ces pics se recouvrent partiellement. Avec cette phase stationnaire, les α-cétols sont bien isolés les uns des autres.

2 - "Nombres stéroïdiques" des estrogènes et de leurs dérivés

Les "nombres stéroïdiques" (N S) des estrogènes sont calculés selon la méthode de VAN DEN HEUVEL et HORNING [90] sur les temps de rétention obtenus pour les estrogènes avec trois phases stationnaires : OV 1, QF 1, et XE 60. Cependant les estrogènes acétylés présentent parfois un T R très supérieur à celui de l'androstane et du cholestane. Nous avons donc été obligé d'effectuer ce calcul en deux temps. Dans un premier temps, nous avons calculé le N S de deux estrogènes (qui nous servirons ensuite de témoins) par rapport au cholestane et à l'androstane. Ensuite en nous servant de ces deux témoins, nous avons calculé le N S des autres estrogènes.

a) "Nombres stéroïdiques" des estrogènes chromatographiés sur OV 1.

Dans un premier temps, nous calculons le N S des acétates du 17-désoxo-estrone et de l'estriol en traçant sur un graphique semi-logarithmique, une droite dont les deux points de référence sont :-en ordonnée (échelle logarithmique) la valeur 1,00 attribuée au 5α-cholestane, et la valeur du temps de rétention relatif (par rapport au 5α-cholestane) du 5α-androstane.

- en abcisse, nous attribuons la valeur N S 27 pour le cholestane et 19 pour l'androstane.

Sur ce graphique, nous portons les temps de rétention relatifs au 5α-cholestane des acétates de 17-désoxo-estrone et d'estriol en ordonnée . En utilisant la droite précédemment construite, nous lisons les N S des deux estrogènes : soit N S 22 pour la 17-désoxo-estrone et 29,25 pour l'estriol. Il est évident que les

T R R de tous ces composés sont étudiés dans les mêmes conditions et en même temps. Connaissant ainsi les N S attribués aux acétates de 17-désoxo-estrone et d'estriol, nous utilisons ces composés pour tracer une seconde droite. Nous portons en abcisses leur nombre stéroïdique et en ordonnées leur temps de rétention relatif à l'acétate d'estrone. Cette droite est alors utilisée pour la détermination des N S de tous les estrogènes étudiés.
Le tableau IXL donne les résultats obtenus.

TABLEAU IXL

"NOMBRE STEROIDIQUE" DES ESTROGENES SUR OV 1

Composés	Libres	3-méthyl éthers	3-méthyl éthers acétates	Acétates
17-désoxo-estrone	22	21,6		23
Estrone	24,5	23,8		25,5
Estrone-16	24,4	23,8		25,5
Estradiol-17β	24,4	24	25,5	26,9
Estradiol-16β	24,4	24	25,5	26,7
Estradiol-17α	24,4	24	25,1	26,7
Estradiol-16α	24,4	24	25,1	26,8
16α-hydroxy-estrone	25,7	25,2	26,8	28,3
16β-hydroxy-estrone	25,7	25,4	26,9	28,4
16-céto-estradiol	25,7	25,4	27	28,6
16-céto-estrone	26,1	25,6		27,2
Estriol	26,7	26,3	27,7	29,2
16-épi-estriol	26,7	26,3	28,3	30
17-épi-estriol			28,1	29,7
16,17-épi-estriol	26,7	26,3	27,8	29,5

b) "Nombre stéroïdique" des estrogènes sur QF 1

La droite qui nous servira à déterminer les nombres stéroïdiques (tableau XL) est établie suivant les mêmes principes que pour l'OV 1. Ne pouvant cependant déterminer directement le nombre stéroïdique de l'acétate d'estriol (son T R R par rapport au 5α-cholestane étant trop important), nous utilisons l'acétate d'estrone pour déterminer le second point de la droite. Pour tracer la seconde droite, les temps de rétention sont toujours calculés par rapport à celui de l'acétate d'estrone.

TABLEAU XL

"NOMBRE STEROIDIQUE" DES ESTROGENES SUR QF 1

Composés	Libres	3-méthyl éthers	3-méthyl éthers acétates	Acétates
17-désoxo-estrone	24,4	22,9		27,4
Estrone	31,9	30,1		35,4
Estrone-16	31,9	30,1		35,9
Estradiol-17β	29,3	27,8	30,2	35,4
Estradiol-16β	29,3	27,8	30,6	35,8
Estradiol-17α	29,2	27,4	30	35,3
Estradiol-16α	29,5	27,8	30,1	35,4
16α-hydroxy-estrone	33,8	31,9	35,3	41,1
16β-hydroxy-estrone	33,8	31,9	36	41,7
16-céto-estradiol	33,8	31,9	36,4	42,3
16-céto-estrone	39,2	36,6		42,3
Estriol	33,9	31,9	35,4	40,8
16-épi-estriol		31,9	37,7	43,4
17-épi-estriol		31,9	37,2	42,9
16,17-épi-estriol	33,9	31,9	36	41,6

c) "Nombre stéroïdique" des estrogènes sur XE 60

Nous déterminons dans un premier temps le nombre stéroïdique de l'acétate d'estrone en procédant selon la modalité décrite au paragraphe (a). La seconde droite est traçée en utilisant le 5α-cholestane et l'acétate d'estrone comme points de références. Les N S donnés dans le tableau XLI sont obtenus en portant sur la courbe les T R R de chaque estrogène calculés par rapport à l'acétate d'estrone.

TABLEAU XLI

"NOMBRE STEROIDIQUE" DES ESTROGENES SUR XE 60

Composés	Libres	3-méthyl éthers	3-méthyl éthers acétates	Acétates
17-désoxo-estrone	27	22,7		27
Estrone	35,4	30,1		35,3
Estrone-16	35,8	30,5		36
Estradiol-17β	34,6	29,8	30,7	35,7
Estradiol-16β	34,3	29,8	30,9	35,8
Estradiol-17α	34,1	29,7	30,7	35,2
Estradiol-16α	34,5	29,7	30,4	35,3
16α-hydroxy-estrone		33,9	36,4	42,1
16β-hydroxy-estrone		33,9	36,8	42,8
16-céto-estradiol		33,9	37,9	43,3
16-céto-estrone		37,2		
Estriol		36,8	36,4	41,4
16-épi-estriol			38,6	43,9
17-épi-estriol		37,1	37,1	41,9

d) Contribution de différentes fonctions au "Nombre stéroïdique"

Le tableau XLII montre la participation des différentes fonctions au nombre stéroïdique des estrogènes étudiés. Les contributions sont calculées en soustrayant du N S du stéroïde possèdant la ou les fonctions étudiées, le N S du composé de base. Ce composé sera ici la 17-désoxo-estrone et ses dérivés 3-méthylés ou 3-acétylés.

TABLEAU XLII

INCREMENTS FONCTIONNELS

Δ NS = NS Steroïde - NS 17-désoxo-estrone (ou dérivé acétylé ou méthylé)

FONCTIONS	STEROIDES	Δ NS		
		OV 1	QF 1	XE 60
17-céto	E_1	2,5	7,5	8,4
	E_1-3-Me.	2,2	7,2	7,4
	E_1-acét.	2,5	8,0	8,3
16-céto	E_1-16	2,4	7,5	8,8
	E_1-16, 3-Me.	2,2	7,2	7,8
	E_1-16-acét.	2,5	8,5	9,0
17β-OH	E_2	2,4	4,9	7,6
	E_2-3-Me.	2,4	4,9	7,1
17α-OH	E_2-17α	2,4	5,1	7,1
	E_2-17α-3-Me.	2,4	4,9	7,0
16β-OH	E_2-16β	2,4	4,9	7,3
	E_2-16β-3-Me.	2,4	4,9	7,1
16α-OH	E_2-16α	2,4	5,1	7,5
	E_2-16α-3-Me.	2,3	4,9	7,0
16α-OH-17-céto	16α-OH-E_1	3,7	9,4	
	16α-OH-E_1-3-Me.	3,6	9,0	11,2
16β-OH-17-céto	16β-OH-E_1	3,7	9,4	
	16β-OH-E_1-3-Me.	3,8	9,0	11,2
16-céto-17β-OH	16-céto-E_2	3,7	9,4	
	16-céto-E_2-3-Me.	3,8	9,0	11,2
16,17-dicéto	16-céto-E_1	4,1	14,8	
	16-céto-E_1-3-Me.	4,0	13,7	14,5

.../...

TABLEAU XLII (Suite)

FONCTIONS	STEROIDES	Δ NS		
		OV 1	QF 1	XE 60
16α,17β-di-OH	Estriol Estriol-3-Me.	4,7 4,7	9,5 9,0	 14,1
16β,17β-di-OH	16-épi-E_3 16-épi-E_3-3-Me.	4,7 4,7	 9,0	
16β,17α-di-OH	16,17-épi-E_3 16,17-épi-E_3-3-Me.	4,7 4,7	9,0 9,0	 14,4
17β-acétoxy	E_2 E_2-3-Me.	3,9 3,9	8,0 7,3	8,7 8,0
17α-acétoxy	E_2-17α E_2-17α-3-Me.	3,7 3,5	7,9 7,1	8,2 8,0
16β-acétoxy	E_2-16β E_2-16β-3-Me.	3,7 3,9	8,4 7,7	8,8 8,2
16α-acétoxy	E_2-16α E_2-16α-3-Me.	3,8 3,5	8,0 7,2	8,3 8,0
16α-acétoxy-17-céto	16α-OH-E_1 16α-OH-E_1-3-Me.	5,3 5,2	13,7 12,4	15,1 13,7
16β-acétoxy-17-céto	16β-OH-E_1 16β-OH-E_1-3-Me.	5,4 5,3	14,3 13,1	15,8 14,1
17β-acétoxy-16-céto	16-céto-E_2 16-céto-E_2-3-Me.	5,6 5,4	14,9 13,5	16,3 15,2
16α,17β-di-acétoxy	E_3 E_3-3-Me.	6,2 6,1	13,4 12,5	14,4 13,7
16β,17β-di-acétoxy	16-épi-E_3 16-épi-E_3-3-Me.	7,0 6,7	16,0 14,8	16,9 15,9
16α,17α-di-acétoxy	17-épi-E_3 17-épi-E_3-3-Me.	6,7 6,5	15,5 14,3	16,1 15,3
16β,17α-di-acétoxy	16,17-épi-E_3 16,17-épi-E_3-3-Me.	6,5 6,2	14,2 13,1	14,9 14,0

Le tableau suivant (XLIII) indique la moyenne des incréments apportés par la méthylation ou l'acétylation des groupes hydroxyles.

TABLEAU XLIII

INCREMENTS PRODUITS PAR L'ACETYLATION OU LA METHYLATION DES GROUPES HYDROXYLES

	Δ NS		
	OV 1	QF 1	XE 60
3-OH ⟶ 3-O-CH_3	- 0,4	- 1,8	- 4,7
3-OH ⟶ 3-O-CO-CH_3	1,1	3,4	0,0
17-OH ⟶ 17-O-CO-CH_3	1,3	2,7	1,0
16-OH ⟶ 16-O-CO-CH_3	1,3	2,9	1,1
16,17-di-OH ⟶ di-O-CO-CH_3	1,8	4,4	- 0,4
α-cétols ⟶ 16 ou 17-O-CO-CH_3	1,6	4,5	3,1

Le tableau **XLIV** met en évidence l'influence d'un substituant en position 3 sur le "nombre stéroïdique" des groupements en position 16 ou 17 de la molécule.

TABLEAU **XLIV**

INFLUENCE DU SUBSTITUANT EN POSITION 3 SUR LE Δ N S DES FONCTIONS EN POSITION 16 ou 17

Dérivé en 3	Δ N S			
	16α-acétoxy-17-oxo	16-oxo-17β-acétoxy	16α,17α-diacétoxy	16β,17α-diacétoxy
3-acétate	13,7	14,9	13,4	16,0
3-Me-éther	12,4	13,5	12,5	14,8

Les renseignements fournis par ces différents tableaux sont discutés **page 126**

3) Discussion

Les phénolstéroïdes ayant plusieurs groupements hydroxyles ou cétones fonctionnels dans leur molécule présentent une adsorption irréversible importante sur les colonnes. Cette adsorption peut s'accompagner parfois d'une décomposition partielle du stéroïde. Nous l'avons constaté en particulier pour les isomères en cis de l'estriol chromatographiés sur colonne de QF 1.

D'autre part, nous n'avons pas pu obtenir de séparation entre les différents isomères sur aucune des colonnes étudiées. Il est donc nécessaire de faire des dérivés.

La méthylation de l'hydroxyle phénolique diminue la polarité du stéroïde et son temps de rétention. Nous avons pu ainsi chromatographier les deux isomères cis de l'estriol.

Avec G. CHARANSOL [106], nous avons montré qu'en méthylant les fonctions alcool du stéroïde nous diminuons encore le temps de rétention et supprimons complètement l'adsorption irréversible sur la colonne. Cependant, si la formation de ces dérivés améliore le fractionnement des isomères, nous n'avons pu séparer les estriols qu'en deux groupes (cis glycols et trans glycols).

Parmi les autres dérivés proposés par les auteurs, les triméthylsilyl-éthers ont certainement été les dérivés les plus étudiés. A l'avantage de ceux-ci, on peut noter une très faible adsorption irréversible sur la colonne et un rendement de synthèse élevé.

La chromatographie peut se faire à une température relativement basse et la séparation des composés est bonne. Cependant, les

triméthylsilyl-éthers présentent une stabilité très limitée et leur synthèse peut être profondément perturbée par la présence d'impuretés.

WOTIZ et CHATTORAG [95] ont montré que les acétates étaient les dérivés les plus adaptés à la chromatographie gazeuse.

HARTMAN [107], dans une étude sur la relation entre le comportement chromatographique et la structure des stéroïdes, a comparé trois dérivés : acétates,triméthylsilyl-éthers, trifluoro-acétates. Il a indiqué que la contribution d'un groupement au temps de rétention de la molécule est additive seulement dans le cas du groupe acétate.

De notre côté, nous avons montré [96] que ces derniers dérivés permettaient d'obtenir un bon fractionnement des estrogènes.

Dans le travail présenté ici, nous avons poursuivi l'étude systématique entreprise avec la chromatographie sur papier et sur couche mince, sur le comportement chromatographique des estrogènes oxygénés en position 16 et 17 ainsi que sur leurs dérivés méthylés et acétylés.

Les T R R obtenus sur plusieurs phases dites "polaires" ou "non polaires" et le calcul du "nombre stéroïdique" nous ont permis de faire un certain nombre d'observations sur le fractionnement des estrogènes et l'utilité des différentes phases stationnaires.

La détermination du " N S" d'un stéroïde ou des groupements fonctionnels ne peut constituer une preuve de la structure d'une molécule. Cependant, cet indice peut faciliter cette détermination ainsi que l'étude de la relation entre groupement fonctionnel et phase stationnaire. D'autre part, le " N S" est relativement indépendant des conditions opératoires (température, débit du gaz

porteur, quantité de phase stationnaire). Il présente donc une précision d'information supérieure pour l'utilisation des résultats de laboratoire à laboratoire.

Les valeurs "N S" que nous donnons dans les tableaux XLII et XLIII fournissent des indications sur le choix d'une phase stationnaire en fonction du but recherché. La phase stationnaire QF 1 présente une grande affinité pour les fonctions cétoniques. La séparation des fonctions cétoniques des fonctions alcooliques est maximum avec celle-ci (N S fonction cétone $\simeq$ 7,5; N S fonction alcool $\simeq$ 4,9). L'OV 1 donne un N S identique pour les deux fonctions. Par contre, le groupe acétoxy présente sur QF 1 une valeur N S identique à celle donnée par une fonction cétone et sur OV 1 un incrément largement supérieur. Nous choisissons donc l'OV 1 pour séparer les dérivés acétylés de l'estrone de ceux de l'estradiol. Nous faisons de même pour la séparation du 16-céto-estrone et des α-cétols.

Les interactions entre deux fonctions voisines sont plus importantes sur OV 1 que sur XE 60 et QF 1 (exemple : N S 17-céto = 2,5; N S 17β-OH = 2,4; N S 17-céto-16β-OH = 3,7 au lieu de 4,9 calculé).

La position spatiale du substituant apporte une contribution à la valeur N S du groupe, surtout avec les phases stationnaires QF 1 et XE 60. Nous choisissons celle-ci pour séparer les isomères entre eux.

L'incrément apporté par la méthylation est négative sur toutes les phases stationnaires alors que pour l'acétylation, il est maximum avec le QF 1 et variable suivant la position de la fonction acétylée.

(3-OH ⟶ 3-O-CO-CH_3 N S = 0,
17-OH ⟶ 17-O-CO-CH_3 N S = 1,1).

Il faut également noter que le substituant en position 3 influe sur le comportement du substituant en position 16 ou 17 (tableau XLIV). SCHOLLER et DEHENNIN [108] ont fait une constatation analogue en comparant les N S des dérivés triméthyl-silyl-éthers ou trifluoroacétates.

La méthylation de l'hydroxyle phénolique avant acétylation permet d'obtenir des temps de rétention largement plus faibles que ceux des dérivés totalement acétylés. Ces dérivés peuvent être également utilisés pour l'identification des stéroïdes(fig 4)

En définitive, la chromatographie des estrogènes acétylés sur colonne d'OV 1 permet de fractionner les stéroïdes suivant leurs groupes fonctionnels, la séparation des isomères se faisant sur colonne de QF 1 et de XE 60. Nous avons ainsi obtenu le fractionnement de tous les stéroïdes phénoliques étudiés, à l'exception des estradiols-17α et -16α.

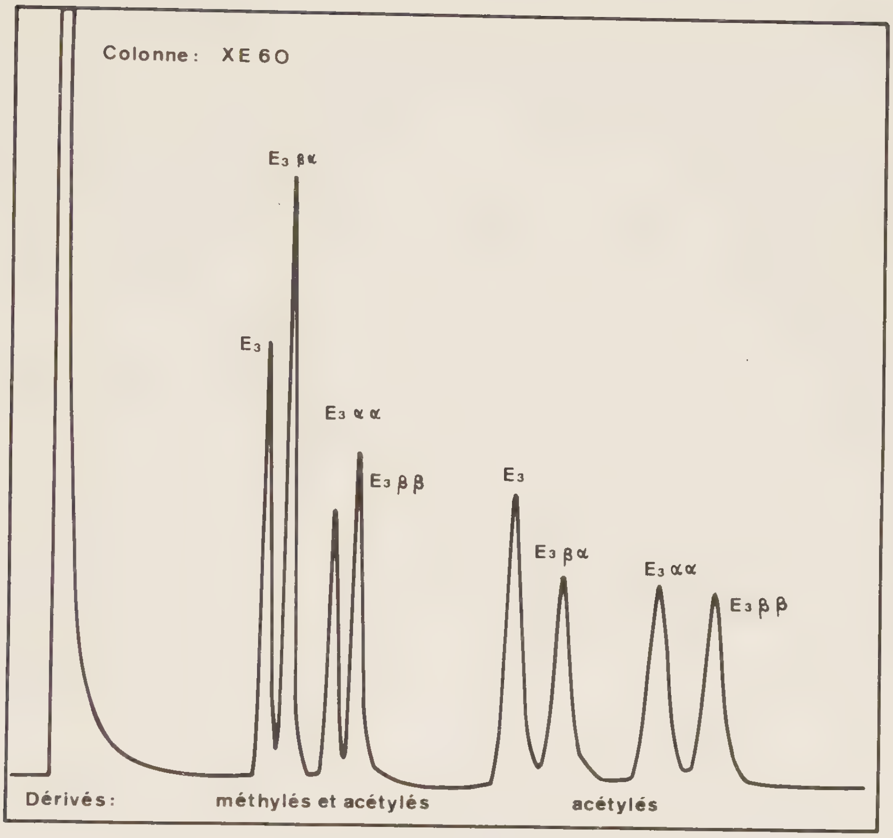


Figure 4 - Fractionnement sur colonne de XE 60 des dérivés de l'estriol.

B) Etude de dérivés d'estrogènes ayant une affinité pour la capture d'électrons.

a) Séparation des monochloracétates, des pentafluorophényl-hydrazones d'estrogènes et de leurs 3-méthyl-éthers

Pour effectuer cette étude nous ne disposions que d'un détecteur à capture d'électrons au tritium, ce qui ne nous permettait pas de travailler à des températures supérieures à 210°. Cela a considérablement restreint le choix et la quantité des phases stationnaires, ainsi que la longueur de la colonne. Voulant maintenir les temps de rétention de l'ensemble des estrogènes étudiés dans des limites raisonnables, nous avons utilisé deux colonnes : l'une de 60 cm sur 2 mm remplie de XE 60 1% sur "gas chrom Q" et l'autre en inox de 150 cm sur 2 mm remplie de graisse de silicone 1% sur "gas chrom Q". Les monochloracétates présentaient sur d'autres phases telles que QF 1 ou SE 30 des temps de rétention trop importants, interdisant leur emploi.

Le tableau XLV donne les temps de rétention relatifs des différents estrogènes étudiés, obtenus sur les deux colonnes retenues.

TABLEAU XLV

TEMPS DE RETENTION DES MONOCHLORACETATES OU DES PENTAFLUORO-PHENYLHYDRAZONES D'ESTROGENES.

COMPOSES	XE 60 1%	DC II (Dow Corning Silicone)
Monochloracétates	TRR*	TRR*
17-désoxo-estrone	0,20	0,57
Estrone	1,00	1,00
Estradiol-17β	2,86	3,19
Estradiol-17β-3-méthyl-éther	0,48	0,83
Estradiol-17α-3-méthyl-éther	0,38	0,81
16α-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	1,43	1,40
16-céto-estradiol-3-méthyl-éther	1,60	1,42
Estriol		14,95
Estriol-3-méthyl-éther	3,62	3,77
16-épi-estriol		15,59
16-épi-estriol-3-méthyl-éther	4,59	4,21
17-épi-estriol-3-méthyl-éther	3,85	3,84
16,17-épi-estriol-3-méthyl-éther	3,65	3,79
Pentafluorophénylhydrazones		
Estrone	1,21	3,96
Estrone-3-méthyl-éther	1,36	2,80
Estrone-16,3-méthyl-éther	1,82	3,21

* TRR = temps de rétention par rapport à celui du mono-chloracétate d'estrone (TR = 8,4 mn sur XE 60 = 5,1 mn sur DC II)

- Aérograph modèle 600 D + stabilisateur de température - colonne inox 0,60 m sur 2 mm pour le XE 60; de 1,50 m pour le DC II - Gas chrom Q 80-100 mesh.
- Température du four : 210° pour la colonne de XE 60 et 206° pour la colonne DC II

  Température de l'injecteur : 250°.
- Débit d'azote : XE 60 = 65 ml/mn - DC II = 85 ml/mn
- TR calculé sur environ quatre essais.

Comme le montrent les résultats décrits sur le tableau XLV le nombre de groupements monochloracétates sur le stéroïde influence considérablement le temps de rétention de celui-ci.

Le di-monochloracétate d'estradiol a un T R plus de trois fois supérieur à celui du monochloracétate d'estrone mais près de cinq fois moins important que celui du tri-monochloracétate d'estriol.

Les interactions entre des substituants voisins ou même éloignés (comme ceux des fonctions 3 et 16 ou 17) semblent augmenter la contribution de chacun au T R de la molécule. La méthylation de l'hydroxyle phénolique, en évitant l'estérification de cette fonction, permet d'abaisser d'une façon considérable le T R de l'estradiol et de l'estriol. Ce dernier devient identifiable sur la colonne de XE 60, ce qui n'était pas le cas pour le dérivé tri-monochloracétate.

Les séparations obtenues pour ces dérivés sur les deux colonnes sont bonnes. On peut ainsi isoler les dérivés méthylés et monochloracétylés de l'estradiol-17β de l'estradiol-17α.

Avec la colonne de XE 60 les pentafluorophénylhydrazones de l'estrone et de l'estrone-16 présentent des T R R différents.

b) Séparation des perfluorooctanoates de quelques estrogènes

Pour étudier ces composés nous avons utilisé les colonnes suivantes : XE 60, QF 1 et OV 1. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau XLVI

TABLEAU XLVI

TEMPS DE RETENTION DES PERFLUOROOCTANOATES D'ESTROGENES

PERFLUOROOCTANOATES	QF 1 (1) TRR Estrone	OV 1 (1) TRR Estrone	XE 60 (2) TRR Estrone
Estrone	1,00	1,00	1,00
Estradiol-17β	1,26	1,64	0,73
Estradiol-17α	0,96	1,24	0,50
16α-hydroxy-estrone	2,74	2,11	2,24
Estriol	3,20	2,78	1,77
16-épi-estriol	4,77	3,80	3,64
17-épi-estriol	3,40	2,77	2,19
16,17-épi-estriol	2,56	2,20	1,12
Acétate d'estrone	1,26	1,07	

T R R = temps de rétention relatif

(1) F et M modèle 402. Température du four = 235°, du détecteur = 258°, de l'injecteur = 278°.

Colonne de 1,50 m sur 2 mm avec OV 1 4% sur aéropack 100-120 mesh - TR E_1 = 7,2 mn

Colonne de 2 m sur 2 mm de QF 1 1% sur gas chrom Q 80-100 mesh - TR E_1 = 5,8 mn.

(2) Aerograph modèle 1200. Température du four = 190°, du détecteur = 215°, de l'injecteur = 260°.

Colonne inox de 1,20 m sur 1 mm avec XE 60 TR E_1 = 15,8 mn.

Ces dérivés ont été synthétisés pour être utilisés avec un détecteur au nickel [63]. Aussi n'avons-nous pas cherché à préparer des colonnes permettant de travailler à des températures inférieures

à 210°. Cependant la colonne de XE 60 donnant des résultats satisfaisants à 190°, nous l'avons prise pour étudier avec un détecteur au tritium, l'activité électronique des perfluorooctanoates.

Les perfluorooctanoates ont avec le QF 1 et l'OV 1 un comportement assez voisin de celui obtenu pour les acétates. Cependant il faut observer que sur QF 1, nous obtenons une bonne séparation entre l'estrone et l'estradiol-17β ainsi qu'entre ce dernier et son isomère-17α.

Le groupement perfluorooctanoate en position 17α du stéroïde a peu d'affinité pour les phases étudiées par rapport au même dérivé en position 17β; en effet, la différence des T R des isomères 17α et 17β de l'estradiol sont importants. L'estriol-16α,17β et l'estriol-16α,17α ont des T R très voisins alors que l'ordre de migration respectif observé pour l'estriol-16α,17β et l'estriol-16β,17α est inversé par rapport au résultat obtenu avec les dérivés acétylés.

La diminution de la polarité provoquée par la perfluoro-octanoylation est très sensible sur le XE 60. Avec cette phase, nous pouvons travailler à 190°. Nous pouvons aussi observer que le di-perfluorooctanoate de l'estradiol présente un T R très sensiblement inférieur à celui du perfluorooctanoate de l'estrone.

Dans l'ensemble, on obtient avec les dérivés à chaînes lourdes d'excellentes séparations.

c) Sensibilité des réponses et échelle de linéarité

L'étude des limites de sensibilité et de l'échelle de linéarité des courbes de réponse du détecteur en fonction du poids de stéroïde

nous ont permis d'obtenir quelques résultats intéressants.

Néanmoins ce travail n'a pu être effectué dans les conditions les plus favorables pour les monochloracétates et les pentafluorophénylhydrazones. En effet cette étude a été faite sur aerograph modèle 600 D muni d'un détecteur au tritium. La limitation de température imposée par ce détecteur (face aux exigences des composés étudiés peu volatils) ne nous a pas permis de faire varier différents paramètres pouvant influer sur la sensibilité et la linéarité. Pour la même raison, nous n'avons pu étudier comparativement ces composés en utilisant un temps de rétention analogue. Le tableau XLVII montre quelques résultats obtenus avec les monochloracétates et les pentafluorophénylhydrazones.

TABLEAU XLVII

SENSIBILITE ET LINEARITE DE LA REPONSE DU DETECTEUR AU TRITIUM AVEC LES DERIVES MONOCHLORACETATES OU PENTAFLUOROPHENYLHYDRAZONES.

MONOCHLORACETATES	SENSIBILITE* en ng	LIMITES DE LA LINEARITE (en ng)
17-désoxo-estrone	1	0 - 80
Estrone	6	0-- 220
Estradiol-17β	40	0 - 250
Estradiol-3-méthyl-éther	2	0 - 150
Estradiol-17α-3-méthyl-éther	2	0 - 150
16-céto-estradiol-3-méthyl-éther	5	0 - 150
16α-hydroxy-estrone-3-méthyl-éther	5	0 - 150
Estriol-3-méthyl-éther	10	0 - 150
16-épi-estriol-3-méthyl-éther	50	-
17-épi-estriol-3-méthyl-éther	10	0 - 200
PENTAFLUOROPHENYLHYDRAZONES		
Estrone	1	0 - 60
Estrone-16	1	0 - 60

Aerograph modèle 600 D - Voltage de la cellule : 40 volts - Sensibilité 10×10^{-12} A - Débit de l'azote : 65 ml/mn.

* Quantité de stéroïde donnant un pic de hauteur au moins trois fois égale aux plus grandes irrégularités de la ligne de

Pour les perfluorooctanoates, nous avons détecté avec un appareil plus sensible (Aerograph modèle 1200) environ 70 pg pour l'estrone, 50 pg pour l'estradiol et environ 200 pg pour la 16α-hydroxy-estrone et l'estriol. On obtient des réponses linéaires jusqu'à 5 à 10 ng.

Les composés étudiés ne montrent aucun signe de décomposition au cours de la chromatographie gazeuse. Ils supportent très bien l'emploi de colonnes en acier inoxydable.

d) Discussion

Plusieurs auteurs ont étudié la relation entre l'affinité électronique, la structure et la composition halogénée des dérivés. Cependant il est difficile de tirer une règle générale d'autant plus que les observations varient selon les auteurs.

Selon EXLEY et DUTTON [109] la réponse en capture d'électrons des dérivés halogénés croît dans l'ordre F $<$ Cl $<$ I, ce qui avait déjà été indiqué par LOVELOCK [110]. Cependant la substitution d'un halogène par un autre plus électronégatif n'a pas une action bien définie sur la réponse (exemple : l'estrone-3-perfluoro-3,5,7,8-tétrachlorooctanoate donne la même réponse que le perfluorooctanoate de l'estrone). D'autre part, l'accumulation des atomes d'halogènes sur une même molécule n'assure pas toujours une augmentation de la réponse de celle-ci : le 2-iodo-estradiol est deux fois plus sensible que le 2,4-di-iodo-estradiol; l'estrone-3-monochloracétate est presque deux fois plus sensible que l'estrone-3-di-chloro-acétate.

La position du substituant halogéné sur la molécule est importante. Selon certains auteurs [111], l'activité des dérivés halogénés des estrogènes est dûe principalement au substituant fixé

sur l'hydroxyle phénolique (par exemple : le 17-monoheptafluoro-butyrate de l'estradiol est près de 100 fois moins sensible que le 3,17-diheptafluorobutyrate). En diminuant la polarité de la fonction phénolique par la méthylation nous avons augmenté d'une façon importante la réponse du dérivé substitué en position 17 (vingt fois).

Dans le cas du monochloracétate de l'estradiol-3-méthyl-éther, l'activité du substituant 17-monochloracétate est la même que celle du substituant 3-monochloracétate de la 17-désoxo-estrone.

Dans les conditions décrites plus haut p.134 nous avons obtenu des réponses pour des quantités minima de l'ordre de quelques nanogrammes pour les monochloracétates et de 1 nanogramme pour les pentafluorophénylhydrazones de l'estrone et de l'estrone-16. Ces quantités ont été diminuées 30 fois environ avec les perfluoro-octanoates de phénolstéroïdes. Ces derniers comptent parmi les dérivés les plus sensibles décrits jusqu'à présent.

EXLEY et DUTTON ont obtenu un seuil de réponse de 10 pg pour le perfluorooctanoate de l'estrone et d'environ 300 pg pour le dérivé monochloracétylé.

Les séparations obtenues en chromatographie gazeuse pour ces différents dérivés sont excellentes. Elles sont voisines et parfois supérieures à celles décrites pour les acétates. En particulier, les perfluorooctanoates d'estradiol-17β et de son isomère 17α sont très bien séparés sur les trois phases stationnaires étudiées. Cependant il est nécessaire d'opérer à des températures élevées pour diminuer le temps de rétention.

Cependant les perfluorooctanoates peuvent être chromatographiés à 190° sur une colonne de 1,20 m contenant un support imprégné de 1% de XE 60. A cette température, tous les stéroïdes étudiés sont chromatographiés en moins de 60 minutes.

Les dérivés halogénés de l'hydroxyle phénolique sont souvent difficiles à obtenir [104]. Dans de nombreux cas, ils sont instables en particulier sous forme cristalline ou en chromatographie en couche mince. La formation du dérivé 3-méthyl-éther favorise ainsi la synthèse et la stabilité du composé halogéné.

La méthode de synthèse des perfluorooctanoates proposée page **25** est simple et rapide. Elle permet d'obtenir avec les différentes catégories d'estrogènes étudiés des rendements élevés, supérieurs à 90 %. Si ces composés sont facilement détruits dans les solvants polaires, ils se conservent plusieurs mois dans des solvants comme le benzène ou l'hexane.

Les synthèses des pentafluorophénylhydrazones de l'estrone, de son dérivé 3-méthyl-éther et de l'estrone-16 sont faciles et donnent de bons rendements. Ces composés se recristallisent aisément et présentent une bonne stabilité tant sous forme cristalline qu'en solution. Par contre, nous n'avons pu former ces dérivés avec les autres estrogènes cétoniques. Nous n'avons obtenu que des mélanges complexes à partir des α-cétols, sous forme libre ou 3-méthyl-éther.

DEUXIEME PARTIE

- SYNTHESE D'ANTIGENES EN VUE DE LA FORMATION D'IMMUNSERUMS SPECIFIQUES DE L'ESTRADIOL ET DE L'ESTRIOL.

- ETUDE COMPARATIVE DE DIFFERENTS IMMUNSERUMS.

- APPLICATION DE LA RADIOIMMUNOLOGIE AU DOSAGE DES ESTROGENES NON CONJUGUES DE L'URINE.

Ce travail a pour but :

- de préparer des anticorps spécifiques pour leur utilisation comme anti-stéroïdes dans des études biologiques, pour l'étude de la spécificité de la liaison anticorps-stéroïde et pour leur utilisation au dosage radio-immunologique des estrogènes libres plasmatiques ou urinaires.

- de préparer des stéroïdes couplés à une protéine pour servir à la préparation de colonnes d'affinités utilisées pour l'isolement de protéines spécifiques de ces stéroïdes.

- d'étudier la présence des estrogènes libres dans l'urine afin d'établir des corrélations éventuelles avec les taux des estrogènes libres plasmatiques.

Chapitre I

RADIO-IMMUNOLOGIE

- Synthèse d'antigènes en vue de la formation d'immunsérums spécifiques de l'estradiol et de l'estriol
- Etude comparative de différents immunsérums.

Les molécules de poids moléculaire inférieur à 5 ou 10.000 n'ont pas en général la capacité d'induire une réaction du type immunologique lors de leur introduction dans un organisme vivant. Cependant LANDSTEINER en 1936 [112] a démontré que la fixation d'une petite molécule sur une macro-molécule protéique conduisait à la formation d'un antigène capable de provoquer la production d'anticorps spécifiques de la petite molécule appelée haptène. Cette observation a reçu une première application dans le domaine stéroïdique en 1957 par ERLANGER et al [113] et en 1959 par LIEBERMAN et al [114]. Ces auteurs, après avoir couplé différents stéroïdes à des protéines, les ont injectés à des animaux. Ils ont ainsi obtenu des immunsérums spécifiques de ces stéroïdes.

Le but de ce travail était alors d'utiliser les anticorps antistéroïdes comme instrument d'étude physiologique sur le rôle des stéroïdes dans les processus spécifiques de la reproduction.

Il fallut attendre encore plusieurs années pour que la préparation d'immunsérums antistéroïdes prenne son véritable essor. C'est en effet en 1969 que MIDGLEY, NISWENDER et RAM [115] ont montré la possibilité d'appliquer au dosage des stéroïdes la méthode radio-immunologique décrite par BERSON et YALOW [116] pour le dosage de l'insuline.

Cette méthode est basée sur la compétition entre l'antigène marqué et non marqué pour se fixer aux anticorps spécifiques.

$$Ag^* + Ac \rightleftharpoons Ag^*\ Ac$$

$$Ag^* + Ag + Ac \rightleftharpoons Ag^*\ Ac + Ag\ Ac$$

La quantité d'anticorps Ac et d'antigène marqué Ag* restant constante, toute augmentation d'antigène non marqué Ag entraîne une diminution de la quantité d'antigène marqué qui se fixe aux anticorps.

Pour réaliser un dosage une courbe standard est d'abord établie.

En 1970, ABRAHAM et ODELL (117), EDWARD et PRUDY (118), MIKHAIL et al (119) ont décrit des méthodes de dosage de l'estrone et de l'estradiol utilisant la capacité de l'anticorps de fixer directement l'haptène.

Cette application de l'immunologie semble particulièrement prometteuse. En effet, pour la première fois, on dispose d'un procédé très sensible capable de reconnaître de façon univoque une substance donnée au milieu d'un mélange complexe.

Pour disposer d'une méthode de dosage simple et précise, certaines conditions sont nécessaires, en particulier celles concernant l'immunsérum. Celui-ci doit être stable, spécifique et sensible. La durée de l'incubation doit être assez rapide et la séparation des stéroïdes liés ou non liés, complète.

Dans le domaine des estrogènes, différents antigènes ont été proposés. Jusqu'en 1970, le couplage stéroïde-protéine s'effectuait par l'intermédiaire d'un groupement fonctionnel du stéroïde ou sur une position voisine. Dans la majorité des cas, l'activation de ce

groupement était obtenue en faisant le dérivé hémisuccinate pour les fonctions OH et O-carboxyméthyloxime pour les fonctions cétoniques.

Les protéines porteuses utilisées sont en général l'albumine du sérum de boeuf (B.S.A.), l'albumine du sérum humain (H.S.A.), l'hémocyanine etc. C'est ainsi qu'ont été préparés entre autres :

- L'estrone-17 (O-carboxyméthyl)oxime - BSA par LIBERMAN et al (114),
- L'estrone-2 ou 17-carbamido-HSA par GOODFRIEND et al (120)
- L'estriol-16,17-disuccinate couplé à la BSA par ERLANGER et al (113)
- L'estriol-3-monosuccinate-B S A par TULCHINSKY et ABRAHAM (121)
- L'estradiol-17-hémisuccinate par FERIN et al, en 1968 (122) et CALDWELL et al (123)
- L'estradiol-3-monosuccinate par THORNEYCROFT et al, en 1970 (124)
- L'estradiol-17β-glucuronide-BSA par KELLIE (125)
- L'estrone, l'estradiol et l'estriol-2 ou 4-azobenzoyle-HSA (126).

Les immunsérums obtenus à partir de ces antigènes présentent des réactions croisées à peu près nulles vis-à-vis des stéroïdes non phénoliques mais par contre réagissent d'une façon importante avec un certain nombre d'estrogènes. Cela est dû probablement à la position du stéroïde par laquelle le couplage avec la protéine a été effectué, masquant des caractéristiques essentielles de la molécule. Il est également connu que la position de l'haptène la plus éloignée

de la macromolécule porteuse et du site du couplage est privilégiée comme déterminant antigénique.

Pour pallier cet inconvénient, nous avons préparé en 1971 (127) et en 1972 (128) avec DRAY, de LAUZON et al, des antigènes en couplant l'estradiol et l'estriol par l'intermédiaire de la position 6 de leur molécule. Cette position a l'avantage de mettre en évidence, à l'extérieur de la molécule d'albumine, la structure caractéristique de chaque molécule. Les immunsérums obtenus montrent une grande spécificité vis-à-vis du stéroïde ayant servi d'haptène. Un travail analogue a été, à peu près à la même époque, entrepris par différents auteurs. C'est ainsi qu'ont été préparés :

- l'estradiol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA par EXLEY (129)
- l'estradiol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-HSA par JEFFCOATE et SEARLE (130)
- le 17α-estradiol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA par KUSS et GOEBEL (131)
- l'estrone et l'estriol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA par LINDNER et al (132)
- l'estrone, l'estradiol et l'estriol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA par KUSS et GOEBEL (133)

Le travail que nous décrivons et dont certaines parties ont été faites en collaboration avec S. de LAUZON, F. DRAY, P. ROMBAUTS et al comporte les parties suivantes :

I) Synthèse d'antigènes en vue de la formation d'immunsérums spécifiques de l'estradiol et de l'estriol. Etude analytique des composés obtenus.

II) Etude comparative de différents immunsérums.

RESULTATS

Matériel et Méthodes

- L'albumine sérique de boeuf provient de Behringwerbe A G Marburg Lahn (Germany)
- Le carboxyméthoxylamine hémi-hydrochloride provient de : Aldrich Organic Chimicals
- Les produits, matériels et techniques utilisés pour les radio-immunodosages sont décrits page 194
- Les points de fusion non corrigés ont été pris sur bloc Kofler-Reichter
- Les analyses élémentaires ont été effectuées par le service central de microanalyse de Thiais
- Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur polarimètre Zeiss
- Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur spectromètre Perkin Elmer, modèle 257
- Les spectres UV ont été pris sur spectrophotomètre UV Carl Zeiss M IV Q 3
- Les spectres de masse ont été effectués dans le laboratoire du Professeur PADIEU (Département de Biochimie, Université de Dijon) par G. et B.F. MAUME. Les spectres ont été établis après formation de dérivés triméthylsilyl-éthers pour les fonctions OH et méthoxime pour la fonction cétonique.

L'appareil utilisé est un LKB 9000 - introduction par chromatographie gazeuse (colonne d'OV 17), l'énergie d'ionisation était de 70 ev, le courant de filament de 60 µA et la température de source = 270°.

- Les spectres R.M.N. ont été effectués dans le laboratoire du

Professeur FETIZON par Y. HENRY (Laboratoire de stéréochimie - Faculté des Sciences d'ORSAY).

L'appareil utilisé est un geol C 60 H. Les spectres ont été mesurés à la fréquence de 60 M HZ

Les déplacements chimiques, comptés à partir de la raie du tétraméthylsilane pris comme zéro de référence, sont exprimés en ppm et les constantes de couplage en hertz. Le solvant utilisé est le diméthyl-sulfoxyde deutérié D M So (D_6).

- Détermination du nombre de molécules d'haptène fixées à la protéine -

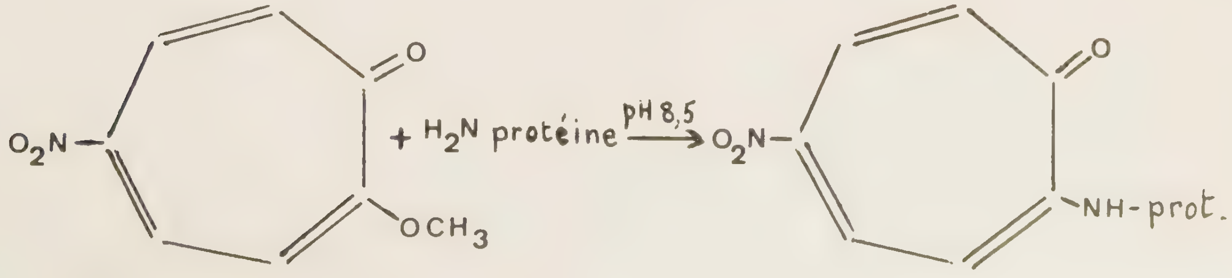
Elle peut se faire par deux méthodes :

a) par la détermination des groupements aminés libres de la protéine restant après couplage de l'haptène.

b) par la détermination du nombre de molécules d'haptène fixées par molécule de BSA, obtenue par la mesure de l'absorption UV du stéroïde.

a) Détermination du nombre de radicaux NH_2 libres -

On utilise la méthode décrite par TAMAOKI [134]. Cette méthode est basée sur la réaction spécifique de la 2-méthoxy-5-nitrotropone avec les groupements aminés libres d'une protéine en solution aqueuse légèrement alcaline suivant la réaction ainsi schématisée.



2 methoxy-5 nitrotropone résidu nitroproponyl

Il en résulte un produit orange ayant une forte bande d'absorption à 420 nm (E = $2{,}07.10^{4}$). La réaction est faite en 3 heures à la température ambiante, la 2-méthoxy-5-nitrotropone étant en solution dans la diméthyl-formamide. Après réaction, la solution est dialysée. Puis une aliquote de celle-ci est prélevée pour mesurer la densité optique. Pour obtenir la concentration en NH_2 libre à partir de la D.O. mesurée, on utilise le coefficient d'extinction molaire de la lysine qui possède le groupement NH_2 conjugué. Le nombre de molécules de stéroïde fixées à la protéine est déduit du nombre de groupements NH_2 libres se trouvant sur la protéine avant et après couplage.

b) Méthode utilisant l'absorption dans l'UV du stéroïde conjugué à l'haptène -

Seul pratiquement, le stéroïde absorbe la lumière dans l'ultraviolet à 262 nm (ε $9{,}86.10^{3}$) en solution dans l'eau à 1 % d'éthanol.

Dans un premier temps, on calcule la quantité de protéine présente dans la solution d'antigène par la méthode du biuret puis on détermine la densité optique aux différents λ de cette solution. On fait également cette mesure sur une solution de B.S.A. à concentration identique et on déduit la densité optique dûe aux groupements E_2 ou E_3-6-C M O. Connaissant les quantités de B.S.A. et de E_2 ou E_3-6-C M O présentes, on peut en déduire le nombre de molécules de stéroïde fixées à la B.S.A.

I) - Synthèse d'antigènes 17β-estradiol-6-(O-carboxy-méthyl)oxime sérum albumine de boeuf et estriol-6-(O-carboxy-méthyl)oxime sérum albumine.

Les deux antigènes ont été préparés à partir de l'estradiol et de l'estriol suivant un processus commun schématisé dans la figure I

Les dérivés 6-céto de l'estradiol et de l'estriol sont formés par oxydation chromique des acétates correspondants selon le procédé décrit par LONGWELL et WINTERSTEINER [135]. Après formation du dérivé carboxy-méthyl-oxime en position 6 par l'action de l'O-carboxy-méthoxylamine, le couplage de l'haptène à la protéine est effectué par l'intermédiaire d'un anhydride mixte [113] sur le groupement aminé libre du résidu lysine de la protéine B S A.

Partie expérimentale -

- 6-céto-estradiol -

Le 6-céto-estradiol a été préparé selon la méthode décrite par LONGWELL et WINTERSTEINER [135]. Le produit pour analyse a un point de fusion de 281-284° (LIT [135] 281° - 283°). $(\alpha)_D$ + 24 éthanol.

- Analyse $C_{18}H_{22}O_3$ Calculé C = 75,49 H = 7,74
Trouvé C = 75,50 H = 7,6

- Spectre de masse - Après formation de dérivés triméthylsilylés (TM si) sur les fonctions OH et O-méthyloxime (M.O.) pour les fonctions cétones, on obtient un pic moléculaire M^+ à m/e = 459 (pour P.M. calculé 459).

m/e = 444 M-15 ⟶ perte du méthyl angulaire
m/e = 428 M-31 ⟶ perte du OCH_3 du méthoxime
m/e = 338 M-90-31 ⟶ perte du fragment HO-Si $(CH_3)_3$

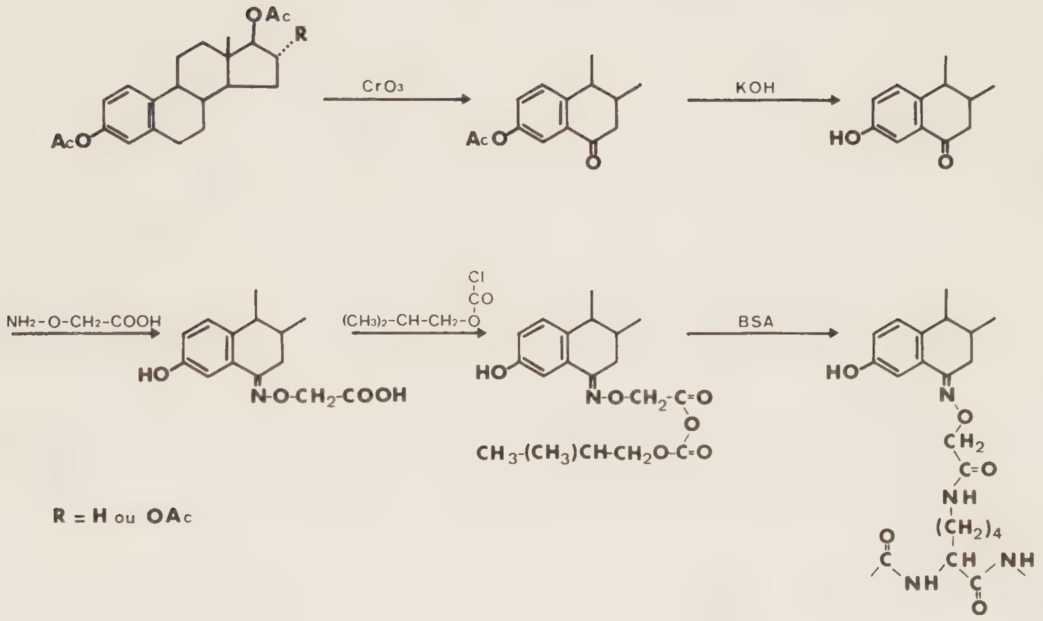


Figure 1 - Synthèse de conjugués 6-(O- Carboxyméthyl)oxime - BSA des estrogènes.

Spectre R M N δ [$(CD_3)_2$ So]

δ = 0,68 ppm 3H singulet (18 CH_3)
3,46 ppm 1H singulet (OH 3) disparait après D_2O
3,65 ppm 1H singulet élargi (H-17α) ne disparait pas après D_2O
4,65 ppm 1H doublet (OH 17), couplé au 17α H disparait après D_2O
7,3 ppm 3H multiplet (H noyau aromatique)

- 6-céto-estriol -

a été obtenu à partir de l'estriol avec un rendement de 8 %.

F = 238° - 241° (LIT [136] 240°)

$(\alpha)_D^{20}$ - 3° dans l'éthanol

-Analyse $C_{18}H_{22}O_4$ Calculé C = 71,50 H = 7,33
Trouvé C = 70,38 H = 7,15

-Spectre de masse (après formation de dérivés TMSi et MO)

Pic moléculaire M^+ à m/e = 547 (PM calculé 547)

m/e = 532 M - 15 ⟶ perte du méthyl angulaire
m/e = 516 M - 31 ⟶ perte du $O-CH_3$
m/e = 426 M - 90 - 31 ⟶ perte du fragment $HO-Si-(CH_3)_3$

- Spectre R M N [$(CD_3)_2$ So]

0,68 ppm 3H singulet (18 - CH_3)
3,47 ppm 2H singulet élargi (un proton disparait après D_2O = OH 3-phénol, l'autre reste H 17α car on le retrouve sous forme de doublet après D_2O)
3,9 ppm 1H singulet élargi (H 16β)
4,8 ppm 2H multiplet (OH 16, OH 17) disparait après D_2O
7,25 ppm 3H multiplet (H noyau aromatique).

- Dérivés 6-(O-carboxyméthyl)oxime (6-C M O) -

La synthèse s'effectue par action du chlorhydrate de l'O-carboxyméthoxylamine sur la fonction cétone du stéroïde en présence d'une base. Celle-ci peut être soit la pyridine, soit une solution aqueuse de soude.

Dans les deux cas, la synthèse s'effectue avec un excellent rendement. Le produit obtenu en milieu pyridine présente en chromatographie sur couche mince une légère tache voisine du 6-C M O.

- Estradiol-6-(O-carboxyméthyl)oxime (E_2-6-C M O) -

Dans un ballon, on dépose successivement 50 mg de 6-céto-estradiol, 60 mg de chlorhydrate de carboxyméthoxylamine et 10 ml d'éthanol. On dissout l'ensemble par 2 ml de soude à 5 %. Après un reflux d'une heure et demie, on concentre la solution à petit volume, dilue avec de l'eau et acidifie par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique. On obtient un précipité cristallin que l'on filtre et lave avec de l'eau. On obtient 56 mg d'un produit très pur. F = 195° - 200° (avec décomposition)

$(\alpha)_D^{20}$ - 31 Ethanol

- Analyse $C_{20}H_{25}O_5N$

Calculé	C = 66,82	H = 7,01	O = 22,26	N = 3,90
Trouvé	C = 65,66	H = 6,99	O = 23,31	N = 3,94

La chromatographie en couche mince sur gel de silice dans le système dichlorométhane-méthanol (80/20) permet de différencier le 6-céto-estradiol (Rf. 0,69) du E_2-6-CMO (Rf. 0,10).

- Le spectre IR montre la disparition de la bande de vibration de valence du carbonyle cétonique à 1685 cm^{-1} et l'apparition de celle du carbonyle carboxylique à 1710 cm^{-1}.

- Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet obtenu dans le méthanol indique λ_{max} à 255 nm pour le 6-céto-E_2 et de 262 nm pour le dérivé 6-carboxy-méthyloxime.

- Le spectre de masse (sur le dérivé TMSi; P.M. Calculé 575). Pic moléculaire M^+ à m/e = 575. On trouve ensuite les pics correspondant aux fragmentations suivantes :

m/e	= 429	M - 146
m/e	= 428	M - 147 (perte de OCH_2 - COO TMSi)
m/e	= 338	M - 147 - 90 (HO-Si-$(CH_3)_3$
m/e	= 312	M - 263
m/e	= 248	M - 147 - (2 x 90)

- Spectre de R M N $(CD_3)_2$ So

= 0,68	ppm	3 H	singulet ($18-CH_3$)
3,65	ppm	1 H	singulet élargi (H 17α)
4,75	ppm	2 H	singulet (CH_2 de N-O-CH_2-COOH) ne disparait pas après D_2O
7,1	ppm	3 H	multiplet (H noyau aromatique)

- Estriol-6-(O-carboxyméthyl)oxime (E_3-6-C M O) -

Ce composé est synthétisé de façon analogue à l'estradiol-(6-C M O).

Après réaction, on extrait le dérivé de la solution acidifiée par l'éther et on lave la phase organique par l'eau. Après évaporation à sec de l'éther, on "cristallise" le résidu dans le mélange chloroforme-acétone. On obtient un produit pur (par C C M) avec un rendement de synthèse de 95 %.

Point de fusion F = 225° (avec décomposition)

$(\alpha)_D^{20}$ = - 32 C = 0,92 dans l'éthanol.

Analyse $C_{20}H_{25}O_6N$

Calculé C = 63,98 H = 6,71 O = 25,27 N = 3,73

Trouvé C = 63,22 H = 6,81 O = 26,20 N = 3,78

La chromatographie en couche mince sur gel de silice dans le système dichloro-méthane-méthanol (50:50) permet de différencier le 6-céto-estriol (Rf. 1) de l'E_3-6-C M O (Rf. 0,73).

- Le spectre infra-rouge montre la disparition de la bande de vibration de valence du carbonyle cétonique à 1685 cm^{-1} et l'apparition de celle du carbonyle carboxylique à 1710 cm^{-1}.

- Le spectre d'absorption dans l'U.V. obtenu dans l'alcool indique un λ_{max} en nm de 260 (ε 10660) alors qu'il est de 255 (ε 8050) pour le 6-céto-estradiol.

- Le spectre de masse (sur le dérivé TMSi; P.M. calculé 663) présente un pic moléculaire M^+ à m/e = 663. On trouve ensuite les pics correspondant aux fragmentations suivantes :

m/e = 517	M - 146
m/e = 516	M - 147 (perte de OCH_2COO - Si $(CH_3)_3$
m/e = 426	M - 147 - 90 (perte de HO - Si -$(CH_3)_3$
m/e = 400	M - 263
m/e = 336	M - 147 - (2 x 90) 2 fois HO - Si $(CH_3)_3$

- Spectre de R M N [$(CD_3)_2$ So]

0,68	ppm	3 H	singulet (18-CH_3)
3,35	ppm	1 H	singulet élargi (H 17α)
3,9	ppm	1 H	singulet élargi (H 16β)
4,72	ppm	2 H	singulet (CH_2 du N-O-CH_2-COOH) ne disparait pas après D_2O
7,3	ppm	3 H	multiplet (H noyau aromatique).

Conjugaison du 6-(O-carboxyméthyl)oxime-stéroïde à la protéine sérique de boeuf.

Le couplage est effectué selon la technique de l'anhydride mixte décrite par ERLANGER et al [113].

35 mg du stéroïde sont dissous dans 1 ml de dioxane et 0,024 ml de tri-n-butylamine. La solution est refroidie à 10° et 0,013 ml d'isobutylchlorocarbonate sont ajoutés sous agitation. Cette solution est laissée ainsi 20 minutes à 4° puis versée dans une solution alcaline, refroidie, de B S A (0,133 g de B S A dans 3,5 ml d'eau, 3,5 ml de dioxane et 0,133 ml de soude N). Le mélange est laissé sous agitation 1 heure à 4°. De la soude N est ajoutée pour amener le pH de la solution à 9,5. Celle-ci est laissée à nouveau 1 heure à 4°, puis mise à dialyser contre de l'eau distillée pendant 4 jours. La solution est alors transvasée dans un becher et l'antigène est précipité par de l'acide chlorhydrique dilué. Le mélange est conservé pendant 48 heures à 4° puis centrifugé. Le précipité est redissous dans de l'eau distillée et lyophilisé . 80 mg de produit sec sont ainsi obtenus et utilisés pour l'immunisation.

Le nombre de molécules de stéroïde fixées à la protéine est calculé en utilisant les deux méthodes décrites page 144 .
Le résultat est de :

$\simeq$ 28 molécules d'estradiol fixées à la molécule d'antigène estradiol-6(O-carboxyméthyl)oxime-BSA.

$\simeq$ 29 molécules d'estriol fixées à la molécule d'antigène estriol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA.

II) - Etude comparative de différents immunsérums -

Protocole d'immunisation

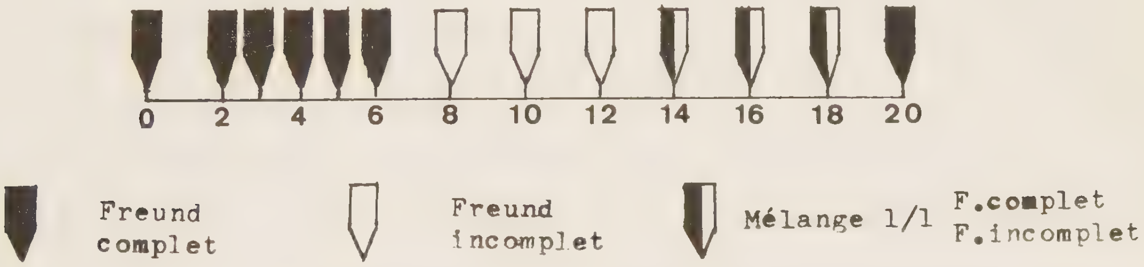
1) Antigène 17β-estradiol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA.

Le lot d'animaux immunisés est constitué de 5 lapines (Newzealand, croisée avec russe grand blanc), 1 lapin, 3 brebis, 1 chèvre et 1 porc.

Une émulsion est préparée à partir de 2 mg d'antigène dissous dans 1 ml de sérum physiologique et 1 ml d'adjuvant de Freund complet ou incomplet (sans B.K.).

L'immunisation est faite par injection sous-cutanée d'une quantité d'émulsion correspondant à 1 mg d'antigène pour les lapines et à 3 mg pour les autres animaux. La dose est répartie en plusieurs sites.

Les injections ont lieu toutes les semaines ou toutes les deux semaines en utilisant des émulsions contenant de l'adjuvant de Freund complet ou incomplet comme l'indique la figure :



Des prélèvements de sang sont effectués à partir de la 5ème semaine pour contrôler le titre. Le sang est prélevé, après la dernière immunisation par ponction cardiaque chez les lapins et au niveau de la jugulaire chez les brebis et la chèvre. Le

sérum est stocké à -20°C.

2) Antigène estriol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA.

L'immunisation a été réalisée selon deux procédés :

Premier procédé :

Six lapines et deux brebis sont immunisées d'une façon analogue à celle décrite précédemment. Seul l'adjuvant de Freund complet est utilisé. Les injections sont faites toutes les semaines.

Deuxième procédé :

La solution d'antigène comporte en plus, du vaccin anti-coquelucheux. Les injections de 1 mg d'antigènes sont faites par voie intradermique en de multiples sites de l'animal (50 environ). Après cette première série d'injections, on fait un rappel à la 8ème semaine et un 2ème rappel à la 20ème semaine.

Etude des immunsérums

L'étude des immunsérums a été faite sous trois aspects : Activité, spécificité, sensibilité.

1. Etude de l'activité

Il est possible d'évaluer l'activité d'un immunsérum en établissant une courbe de dilution de la façon suivante : une série d'incubations de l'immunsérum à dilutions croissantes en présence d'une quantité constante de stéroïde marqué est effectuée. La fraction stéroïde liée à l'antisérum est séparée du stéroïde libre et sa radioactivité mesurée. La courbe obtenue en portant en ordonnée la radioactivité du stéroïde lue en fonction de la dilution

de l'immunsérum comporte en général trois parties :

a) - A faible dilution, toutes les molécules marquées sont liées à l'immunsérum présent en concentration saturante, ce qui se traduit par un plateau de radioactivité élevé.

b) - A partir d'une certaine dilution, l'immunsérum devient quantité limitante, une certaine proportion de stéroïde libre apparait, ce qui se traduit par une diminution de la radioactivité liée.

c) - A très forte dilution, la constante d'affinité de l'immunsérum ne permet pas la formation de complexe, ce qui se traduit par un plateau de basse radioactivité.

Le titre de l'immunsérum est défini par sa dilution à laquelle 50% du traceur radioactif est retrouvé sous forme liée.

Les tableaux suivants (I et II) indiquent l'évolution du titre en anticorps des sérums de différents animaux au cours de l'immunisation. Avec l'antigène Estriol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA, deux méthodes d'immunisation ont été utilisées (Cf. page 154).

TABLEAU I

EVOLUTION DU TITRE DES IMMUNSERUMS 17β-ESTRADIOL-6-(O-CARBOXYMETHYL)OXIME-BSA AU COURS DE L'IMMUNISATION.

Semaines après la 1ère inj.	L A P I N E S				LAPIN	B R E B I S			CHEVRE	PORC
	4392	4398	4385	4386	140	6037	7101	2269	825	7937
8	1/1900	1/290	1/3500	1/4300	1/1400	1/200	1/400	1/1150	1/1100	1/250
9	1/2150	1/1500	1/3000	1/3800	1/1700	1/910	1/200	1/770	1/1500	1/200
14	1/4350		1/7500	1/10000		1/150	1/3500	1/4000	1/6000	1/200
16	1/9000	1/1160	1/11500	1/10000	1/1700	1/1700	1/5900	1/4000	1/5500	
21	1/7400	1/5000	1/12000	1/12000	1/4000	1/1700	1/4000	1/8000	1/7000	

Au cours du R I A   0,1 ml de la dilution d'antisérum est mis en contact avec
0,1 ml d'une solution d'estradiol tritié - 50 pg
(AS 50 Ci/mM)

TABLEAU II

EVOLUTION DU TITRE DES IMMUNSERUMS ESTRIOL-6-(O-CARBOXYMETHYL)OXIME-BSA AU COURS DE L'IMMUNISATION

a) - Immunisation par le procédé 1

Semaines après la 1ère injection	LAPINES		BREBIS
	1244	1258	2038
9	1/120	1/100	1/70
14	1/120	1/450	1/700
16	1/120	1/400	1/1600
28	1/540	1/2000	1/1600
Incubation : 100 µl de la dilution avec 100 µl de solution d'Estriol-6-7 ^{3}H (100 pg) (AS = 42 Ci/mM)			

b) - Immunisation par le procédé 2

Semaines après la 1ère inject.	LAPINES		
	8393	8398	8401
6	1/55	1/40	1/25
9*	1/800	1/250	1/300
15	1/1500	1/1000	1/1700
21*	1/3200	1/1100	1/1300
25	1/8000	1/1800	1/8000
Estriol-6-7 ^{3}H	* une semaine après le rappel		

Procédés d'immunisation 1 et 2 - Cf. page 154

Ces résultats indiquent que mis à part le porc, tous les animaux offrent une bonne réponse à l'immunisation et que les plus hauts titres ont été obtenus chez les lapines. A la 21ème semaine après immunisation par l'estradiol-6-C M O - BSA, le titre de l'immunsérum de deux lapines atteint 1/12.000 tandis que celui d'une brebis est de 1/8.000.

La méthodologie de l'immunisation est importante. Le tableau II montre qu'avec l'estriol-6-C M O - BSA, le titre des immunsérums est au maximum de 1/2000 avec le premier procédé d'immunisation alors qu'il peut monter à 1/8000 au cours de la 25ème semaine avec le deuxième procédé.

2) - Sensibilité des immunsérums

La sensibilité d'un immunsérum peut être définie par la plus petite quantité d'hormone froide pouvant induire une différence statistiquement significative du pourcentage de l'hormone marquée liée aux anticorps.

En pratique, cette sensibilité sera déterminée d'une façon approximative en établissant pour cet immunsérum une courbe standard avec des quantités de stéroīde froid allant de 12 ou 15 pg jusqu'à plusieurs centaines de pg. La dilution de l'immunsérum retenue est celle qui lie 30 à 50 % du traceur radioactif. La technique de la méthode radioimmunologique est décrite page 194

a) Immunsérum anti-17β-estradiol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA

La figure 2 montre les courbes standard obtenues avec les immunsérums de la lapine L 4386 et de la chèvre C 825. Les graphiques sont établis sur papier semi-logarithmique en portant en

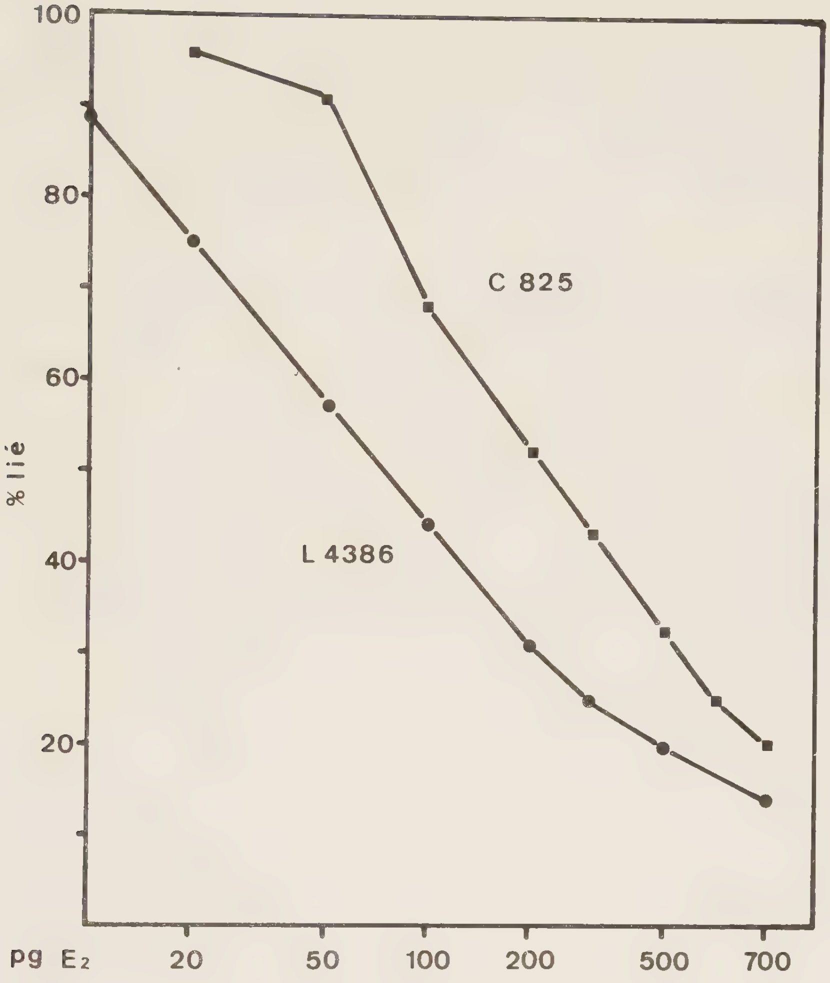


Figure 2 - Courbes standard de l'estradiol obtenues avec les immunsérums Anti-E_2-6-CMO-BSA

Immunsérum de Lapine L 4386
Immunsérum de Chèvre C 825
Estradiol tritié (6-7-^{3}H) 20.000 dpm (50 pg).

ordonnées le pourcentage de liaison du stéroïde marqué et en abscisses le poids en picogrammes d'estradiol froid.

Avec le sérum L 4386 nous obtenons un tracé linéaire pour des quantités d'estradiol allant de 10 à 200 ou 300 pg alors qu'avec le sérum de chèvre, le tracé est linéaire seulement de 100 à 700 pg.

L'immunsérum de lapine possède donc une bonne sensibilité, largement supérieure à celle du sérum de chèvre. Ce dernier permet une exploitation de la courbe jusqu'à 700 pg.

b) Immunsérum anti-estriol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA.

La comparaison des courbes standard établies avec les sérums des lapines L 1244 et L 1258 et de la brebis B 2038 met en évidence la sensibilité supérieure des immunsérums de lapines (environ 25 pg). Avec le sérum L 1258, on a un tracé linéaire avec une pente abrupte pour la gamme d'estriol de 25 à 400 pg. La courbe présente à ses deux extrêmités (6 à 25 pg et 400 à 800 pg) une zone permettant une certaine exploitation.Cf. fig. 3

3) - Etude de la spécificité des immunsérums

On appelle réaction croisée (R.C.) entre deux haptènes distincts la réaction immunologique positive de l'un de ces haptènes avec les anticorps apparus sous l'influence stimulante de l'autre (couplé à un antigène). Il y a plusieurs façons d'étudier les réactions croisées.

Dans ce travail, nous utiliserons deux méthodes :

- Premier procédé -

La méthode d'Abraham (137) que l'on peut résumer ainsi :

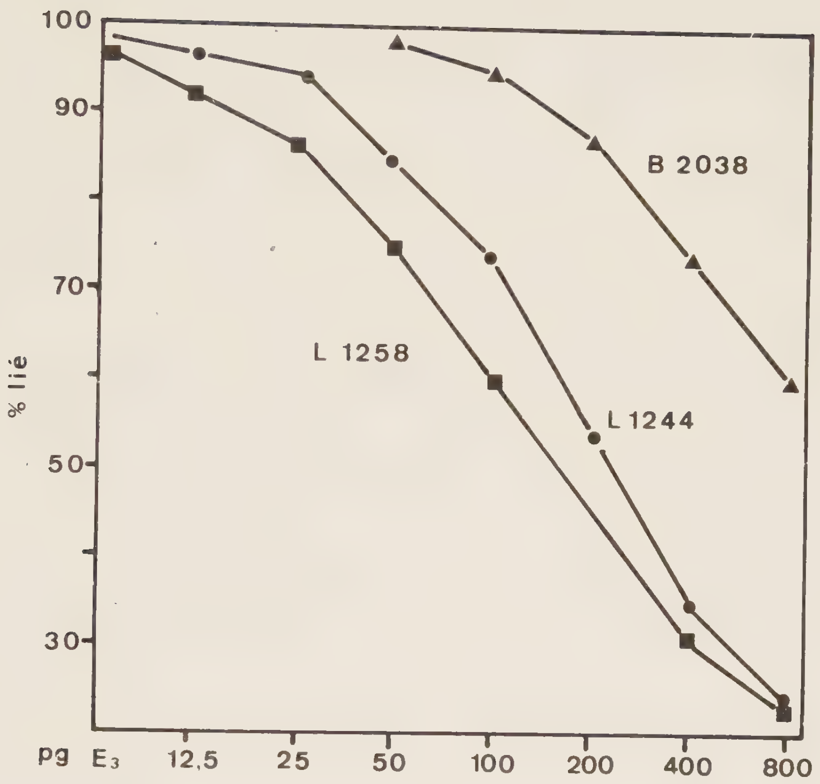


Figure **3** - Courbes standard de l'estriol obtenues avec différents immunsérums anti-E_3-6-CMO-BSA.

Antisérum de Lapine L 1258 à la dilution 1/2.000
Antisérum de Lapine L 1244 à la dilution 1/1.000
Antisérum de Brebis B 2038 à la dilution 1/2.000

(Chaque point représente la moyenne de 2 essais).

Estriol tritié 20.000 dpm (80 pg).

Des quantités croissantes de différents stéroīdes sont mises à incuber avec l'immunsérum étudié. Après le déplacement de l'équilibre par le stéroīde radioactif et la mesure de la fraction liée, les courbes obtenues sont comparées à celle tracée pour le stéroīde témoin dans des conditions identiques.

Les résultats sont exprimés suivant la formule :

$$\% \text{ de R.C. de } y = \frac{X}{y} \times 100$$

dans laquelle X est la quantité de stéroīde témoin déplaçant 50 % de traceur radioactif,

y est la quantité de stéroide étranger déplaçant 50 % du traceur radioactif.

- Deuxième procédé -

Nous avons mis au point un deuxième procédé pour étudier l'interaction produite par des quantités croissantes de stéroīde étranger sur la liaison d'une quantité fixe du stéroīde témoin avec l'immunsérum.

Cette étude est faite en établissant par radio-immunodosage une courbe standard pour des quantités de stéroīde témoin de 25 à 400 pg. Nous étudions dans les mêmes conditions les pourcentages de liaison donnés par des fractions de 200 pg de stéroīde témoin en présence de quantités de stéroīdes étrangers variant de 50 à 12.800 pg.

Les résultats obtenus sont comparés à ceux de la courbe standard et exprimés en picogrammes d'estradiol ou d'estriol.

Nous étudions ainsi différents immunsérums spécifiques ainsi que l'immunsérum anti-estradiol de Caldwell, ce dernier pouvant être également utilisé pour le dosage de l'estriol en utilisant l'estriol radioactif comme traceur.

a) - Etude de la spécificité de l'immunsérum anti-estradiol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA -
Comparaison avec l'immunsérum Caldwell estradiol-17-hémisuccinate.

Le tableau III montre les réactions croisées produites par différents stéroïdes avec l'antisérum de lapine 4386 et celui de la chèvre 825. Elles sont comparées à celles obtenues avec l'immunsérum de Caldwell [138].

Cette étude est faite selon la méthode d'Abraham, le stéroïde témoin étant l'estradiol.

TABLEAU III

- REACTIONS CROISEES DE DIFFERENTS STEROIDES AVEC L'IMMUNSERUM 17β-ESTRADIOL-6-(O-CARBOXYMETHYL)OXIME-BSA.

- COMPARAISON AVEC L'IMMUNSERUM CALDWELL ANTIESTRADIOL-17β-HEMISUCCINATE - BSA (138).

STEROIDES	IMMUNSERUMS		
	E_2 6 CMO - BSA		E_2-17-succinate - BSA
	Sérum de Lapine n° 4386 au 1/1000	Sérum de Chèvre n° 825 au 1/7000	Anti-sérum Caldwell
Estradiol	100	100	100
6-céto-estradiol	12,3	9	-
16-céto-estradiol	1,3	1	-
Estradiol-17α	0,88	0,74	5,1
2-méthoxy-estradiol	0,09	1,6	0,05
Estradiol-17β-glucosiduronate	0,38	0,58	-
Estrone	2	2	63,7
16α-hydroxy-estrone	0,42	0,38	2,6
Estrone-sulfate*	0	1	-
2-méthoxy-estrone	0	0,12	-
16-épi-estriol	5	4	1,6
Estriol	0,52	0,38	18,7
17-épi-estriol	0	0	3,3
16,17-épi-estriol	0	0	3,3
Hexo estrol	0	0	-
Diéthyl-stilboestrol	0	0	
Dieno estrol	0	0	
Androstane-3β-17β-diol	0	0	
Testostérone	0	0	0,0
Progestérone	0	0	0,0

Pourcentage de réactions croisées $\% \text{ R.C.} = \frac{x}{y} \times 100$

Cf. page 162

* Estradiol-6-7 ^3H 20.000 dpm

* Le chiffre 0 signifie que le déplacement de 50 % n'a pu être obtenu pour des concentrations du stéroïde 1.000 fois supérieures à celles de l'estradiol-17β.

Nous pouvons observer à la lecture de ce tableau la grande spécificité des immunsérums obtenus à partir de l'estradiol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA. Le 6-céto-estradiol, produit intermédiaire de la préparation de l'antigène, possède le plus fort pourcentage de R.C. (12,3 %). L'estrone et l'estriol présentent des réactions croisées $\leqslant$ 2 % alors qu'avec l'immunsérum de Caldwell les chiffres sont respectivement de 64 et 19%. Les sérums de lapine et de brebis présentent une spécificité sensiblement du même ordre.

La figure **4** montre le tracé de quelques courbes obtenues dans l'étude des réactions croisées à partir desquelles ont été calculés les résultats décrits précédemment. On peut observer que chaque stéroïde a un comportement particulier vis-à-vis des anticorps. Cela est mis en évidence par le non-parallélisme de ces courbes. Certaines se rapprochent et même se croisent à certains niveaux du pourcentage de liaison.

Nous avons utilisé le deuxième procédé (page **162**) pour étudier avec différents immunsérums la perturbation apportée au dosage de l'estradiol par la présence de quantités variées d'estrone ou d'estriol. Nous avons réalisé cette étude avec l'immunsérum de lapine 4386, avant ou après traitement par le Rivanol, et avec le sérum anti-estradiol de Caldwell.

La figure **5** donne les tracés obtenus pour la courbe standard estradiol et pour les surcharges d'estrone ou d'estriol.

Les tableaux **IV** et **V** présentent les résultats obtenus en équivalent estradiol. L'interférence de l'estrone et de l'estriol sur le dosage est exprimée en pourcentage.

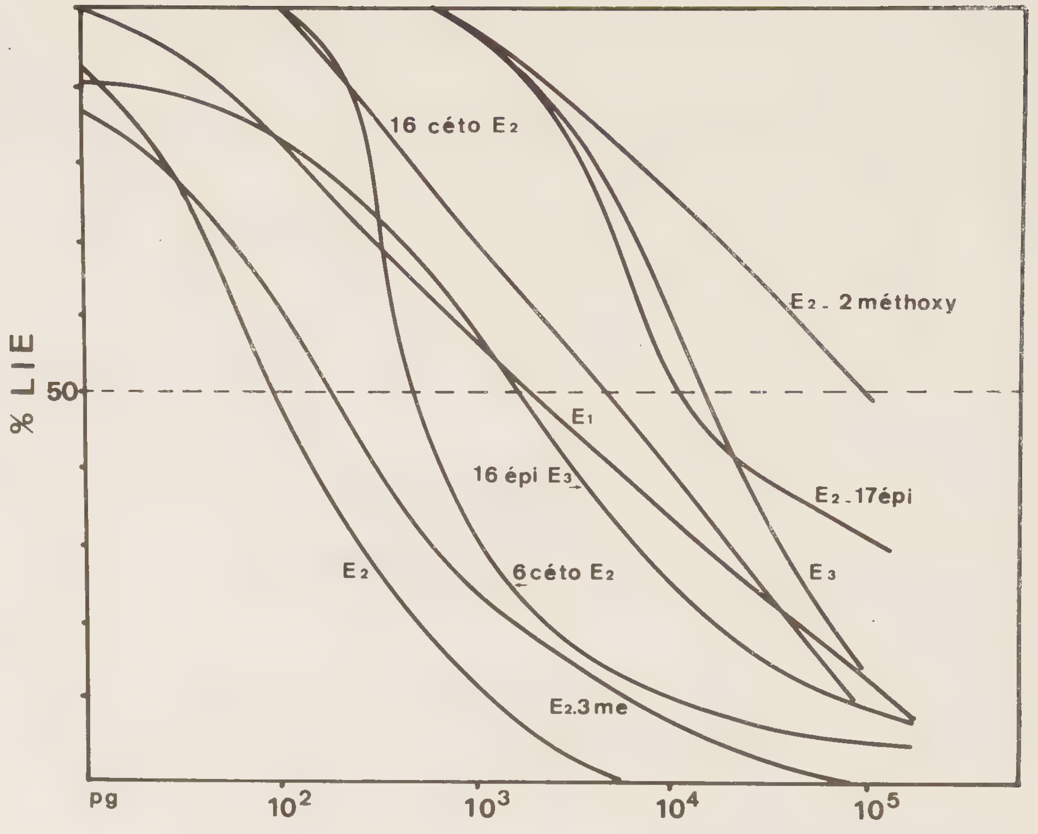


Figure 4 - Réaction croisée de différents stéroïdes avec l'immunsérum L 4386 (Anti-E_2-6-CMO-BSA).

(En ordonnée : pourcentage d'estradiol-6-7-^{3}H lié à l'antisérum. "100%" représente la liaison du traceur à l'antisérum en l'absence de stéroïde froid.)

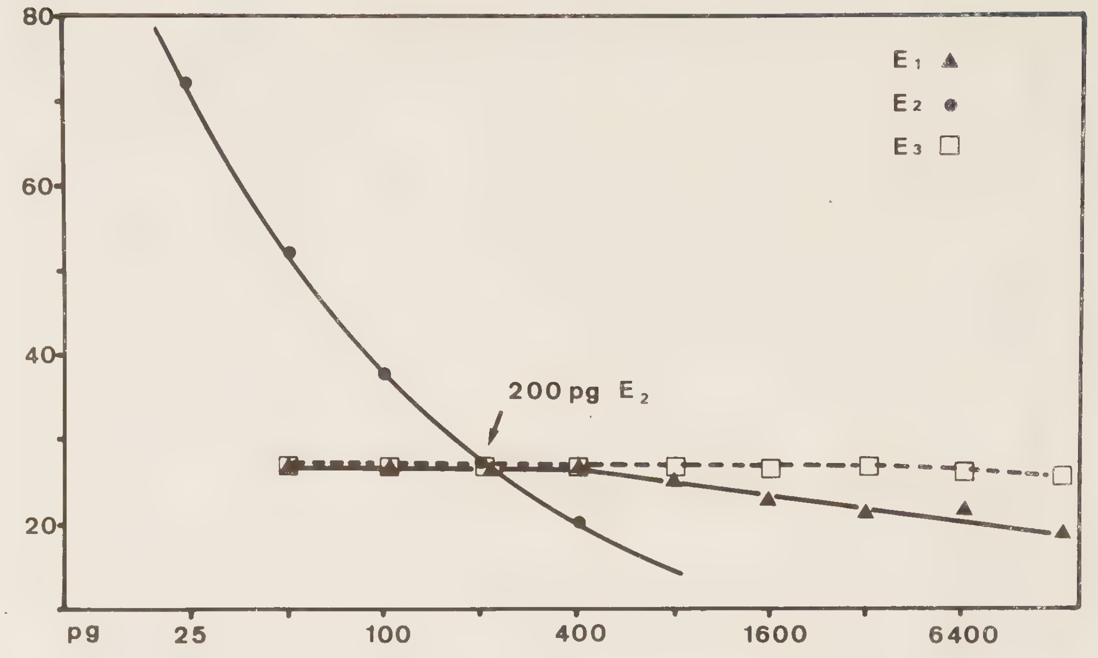


Figure **5** - Influence de quantités croissantes d'estrone ou d'estriol sur la liaison immunsérum L 4386 - estradiol (200 pg).

Courbe standard de l'estradiol.

(Pour les conditions du dosage, cf. tableau IV).

TABLEAU IV

RESULTATS DU DOSAGE DE 200 pg d'ESTRADIOL EN PRESENCE D'ESTRONE AVEC DIFFERENTS IMMUNSERUMS - EXPRIMES EN PICOGRAMMES D'ESTRADIOL.

Interférence exprimée en pourcentage

Quantités ajoutées à 200 pg d'estradiol	Quantités trouvées après dosage				
E_1 en pg	L 4386 pg	%	L 4386 traitée par Rivanol	Anti-E_2 Caldwell pg	%
0	200		200	200	-
50	210		190	240	20
100	195		205	270	35
200	212	6	200	260	30
400	215	7	190	350	75
800	230	15	215	400	100
1600	300	50	280	580	190
3200	340	70	350	$>$	
6400	320	60	470	$>$	
12800	500	150	$>$	$>$	

$>$ = Résultat trop élevé pour être lu sur la courbe

Technique du dosage radio-immunologique, Cf. page 194

Dilution des antisérums :

L 4386 = 1/22.500 (donne 40 % de liaison)
L 4386, traitée par Rivanol = 1/17.500 (40% de liaison)
Anti-E_2 Caldwell = 1/46.000 (43 %).

TABLEAU V

RESULTATS DU DOSAGE DE 200 pg D'ESTRADIOL EN PRESENCE D'ESTRIOL AVEC DIFFERENTS IMMUNSERUMS - EXPRIMES EN PICOGRAMMES D'ESTRADIOL.

Interférence exprimée en pourcentage

Quantités ajoutées à 200 pg d'estradiol	Quantités trouvées après dosage				
	L 4386		L 4386 traitée par Rivanol	Anti E_2 Caldwell	
	pg	%		pg	%
0	200		200	200	
50	185	- 7	190	210	5
100	210	5	190	210	5
200	210	5	192	212	6
400	205	2	185	245	22
800	220	10	200	212	6
1600	210	5	185	260	30
3200	205	2	205	297	48
6400	220	10	205	>	
12800	230	15	215	>	

\> = Résultat trop élevé pour être lu sur la courbe

Technique du dosage radio-immunologique, Cf. page 194

Dilution des antisérums : voir le tableau précédent.

D'après les tableaux IV et V , on peut tirer les observations suivantes :

- Avec l'anti-estradiol Caldwell, 50 pg d'estrone ajoutés à 200 pg d'estradiol entraînent un déplacement de l'estradiol tritié correspondant à 40 pg d'estradiol froid; par contre, il faut 1.600 pg d'estriol pour donner un déplacement correspondant à 60 pg d'estradiol.

- Avec l'anti-estradiol-6-CMO, le déplacement produit par l'estriol peut être considéré comme nul jusqu'à 12.800 pg (30 pg en équivalent E_2). Il est un peu plus important avec l'estrone (1.600 pg donnent une correspondance en estradiol de 100 pg).

La purification de l'immunsérum par le Rivanol ne modifie pas sensiblement les résultats.

- Nous avons également étudié la spécificité de l'immunsérum L 4386 en l'utilisant pour doser l'estradiol directement dans un extrait plasmatique et en comparant les résultats obtenus à ceux donnés par le même sérum mais après purification et fractionnement de l'estradiol, de l'estrone, de l'estriol sur colonne de Sephadex LH 20. Cet essai a été effectué sur 12 échantillons plasmatiques; la méthode radio-immunologique utilisée est décrite page 194

Le tableau VI montre les résultats des dosages avant et après fractionnement chromatographique de l'estradiol et l'écart en pourcentage apporté par le dosage direct.

TABLEAU VI

RESULTATS DU DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'ESTRADIOL DANS DES EXTRAITS DE SERUMS HUMAINS DIRECTEMENT OU APRES SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DE L'ESTRADIOL, AVEC L'IMMUNSERUM L 4386.

Ecart entre les deux dosages et rapport de la différence sur le dosage après purification. — Résultats exprimés en pg par ml de plasma.

Sujet	E_2purifié(E_2P)	E_2brut(E_2B)	E_2B-E_2P(R)	$\frac{R}{E_2P}$ x 100
Mme L	245	265	+ 20	8
Mme M_1	220	230	+ 10	4
Mme M_2	189	205	+ 16	8
Mme P	230	293	+ 63	27
Mme R	213	226	+ 13	6
Mme C	157	196	+ 39	25
Mme G	210	248	+ 38	18
Mme S	476	464	- 12	- 3
Mme V	2935	2463	- 472	- 16
Mme G	78	101	+ 23	29
Mme M	172	217	+ 45	26
Mme C	218	247	+ 29	13

Technique du dosage radioimmunologique : Cf. page 194

Ces résultats confirment la haute spécificité de l'immunsérum anti-estradiol-6-CMO. En effet les écarts constatés entre le dosage de l'estradiol directement sur l'extrait brut et après purification sont très comparables, l'écart entre les deux résultats n'étant pas sensiblement supérieur à la précision de la méthode.

b) - Etude de la spécificité des immunsérums anti-estriol - 6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA. Comparaison avec l'immunsérum Caldwell estradiol-17-hémisuccinate-BSA utilisé avec l'estriol-6-7 ^{3}H.

TABLEAU VII

REACTIONS CROISEES* DE DIFFERENTS ESTROGENES AVEC LES IMMUNSERUMS ESTRIOL-6-(O-CARBOXYMETHYL)OXIME-BSA.

ESTROGENES	IMMUNSERUMS		
	L 1258	L 1244	B 2038
Estriol	100	100	100
6-céto-estriol	57,4		210
6-CMO-estriol	47,4		160
16-épi-estriol	1,74	0,1	1,20
17-épi-estriol	0,19	0,1	0,10
16,17-épi-estriol	0,10	0	0,10
Estradiol-17β	2,92	0	1,00
6-céto-estradiol	5,95		0,10
Estrone	0,50	0	0,10
15α-hydroxy-estriol	5,60	0,54	0,10
16α-hydroxy-estrone	1,74	0,10	0

* Pourcentage de réaction croisée (X/y).100, cf.p.162
Le chiffre 0 signifie que le déplacement de 50 % n'a pu être obtenu pour des concentrations du stéroïde 1.000 fois supérieures à celles de l'estriol.
Estriol-6-7 ^{3}H utilisé ≃ 12.000 dpm.

Le tableau VII met en évidence la spécificité des immunsérums obtenus à partir de l'estriol-6-CMO-BSA. En effet, les réactions croisées obtenues pour l'ensemble des stéroïdes étudiés sont en général très faibles, en particulier avec l'immunsérum de lapine L 1244. Avec le sérum de lapine L 1258, les stéroïdes donnant les plus fortes réactions croisées obtenues sont :

l'estradiol 2,92 % et le 6-céto-estradiol 5,9 %. Les épimères de l'estriol donnent des réactions croisées à peu près nulles à l'exception du 16-épi-E_3 (1,7 %). En outre, on peut observer la différence des réactions croisées données par le 6-céto-estradiol avec les sérums L 1258 et B 2038 (57 et 210 %). L'immunsérum L 1244 donne des réactions croisées à peu près nulles avec l'ensemble des stéroïdes.

Comme pour l'estradiol, nous avons étudié avec différents immunsérums la perturbation apportée au dosage de l'estriol par la présence de quantités variées d'estrone ou d'estradiol. Pour faire cette étude nous avons utilisé les immunsérums de lapine L 1258, L 1244 et l'immunsérum anti-estradiol Caldwell, et comme traceur radioactif, l'estriol-6-7 ^3H (AS 42 Ci/mM).

La figure 6 donne les tracés obtenues avec l'immunsérum L 1244.

Les tableaux VIII et IX détaillent les résultats obtenus avec différents immunsérums.

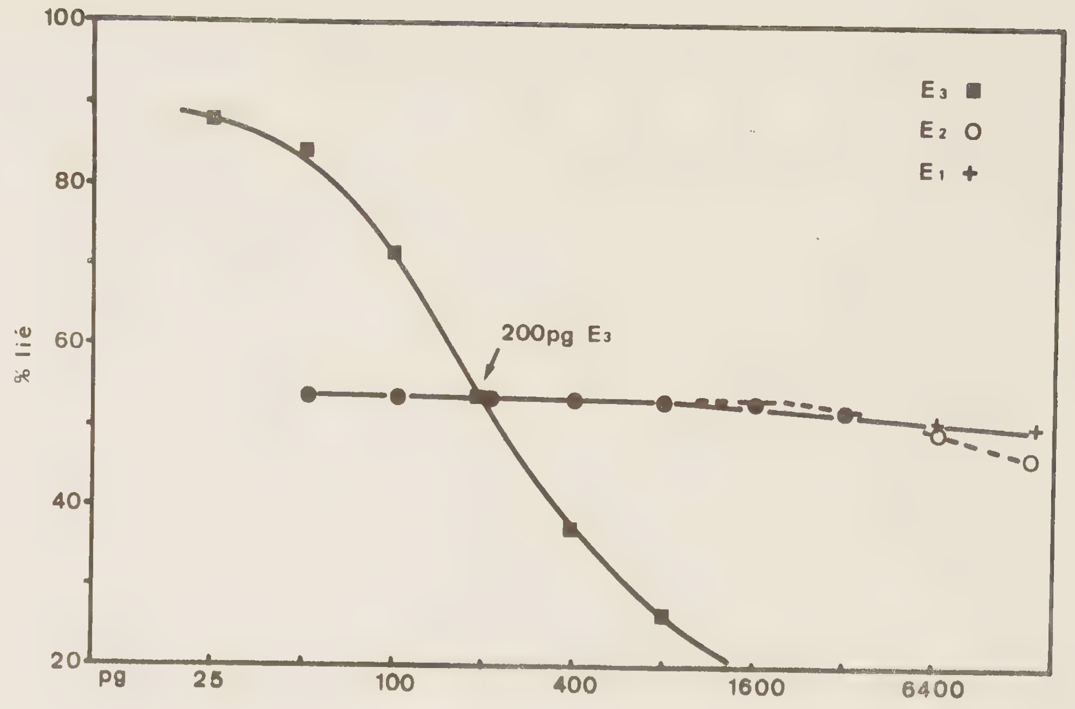


Figure 6 - Influence de quantités croissantes d'estrone ou d'estradiol sur la liaison immunsérum L 1244 - estriol (200 pg).

Courbe standard de l'estriol.

(Pour les conditions du dosage, cf. tableau VIII).

TABLEAU VIII

RESULTATS DU DOSAGE DE 200 pg D'ESTRIOL EN PRESENCE D'ESTRONE AVEC DIFFERENTS IMMUNSERUMS - RESULTATS EXPRIMES EN pg D'ESTRIOL -

Interférence exprimée en pourcentage.

Quantités ajoutées à 200 pg d'estriol	Quantités trouvées par dosage					
E_1 en pg	Lapine 1244		Lapine 1258		Anti-E_2 Caldwell	
	pg	%	pg	%	pg	%
0	200		200		200	
50	195	- 2	230	15	380	90
100	200	0	240	20	520	160
200	200	0	250	25	>	
400	200	0	240	20	>	
800	200	0	250	25	>	
1600	205	2	290	45	>	
3200	210	5	320	60	>	
6400	215	7	370	85	>	
12800	225	12	370	85	>	

> = quantité trop élevée pour être lue sur la courbe standard -

Technique du dosage radioimmunologique, cf. page 194

Dilution des antisérums : L 1244 = 1/1.000 (donne 50 % de liaison), L 1258 = 1/1800 (71%), Anti-O_2 Caldwell 1/10.000 (28%).

TABLEAU IX

RESULTATS DU DOSAGE DE 200 pg D'ESTRIOL EN PRESENCE D'ESTRADIOL AVEC DIFFERENTS IMMUNSERUMS - RESULTATS EXPRIMES EN pg D'ESTRIOL.

Interférence exprimée en pourcentage

Quantités ajoutées à 200 pg d'estriol	Quantités trouvées par dosage					
E_2 en pg	Lapine 1244		Lapine 1258		Anti-E_2 Caldwell	
	pg	%	pg	%	pg	%
0	200		200		200	
50	200	0	250	25	510	200
100	200	0	270	35	>	
200	210	5	280	40	>	
400	210	5	330	65	>	
800	195	- 2	340	70	>	
1600	200	0	340	70	>	
3200	205	2	400	100	>	
6400	235	12	440	120	>	
12800	270	35	500	150	>	

> = quantité trop élevée pour être lue sur la courbe standard

La lecture des tableaux VIII et IX montre la haute spécificité de l'immunsérum de lapine L 1244. Avec celui-ci on peut doser 200 pg d'estriol dans un milieu contenant 64 fois plus d'estrone ou d'estradiol avec un résultat augmenté seulement de 12 % dans le cas de présence de l'estrone (chiffre non significatif) et de 35 % dans le cas de présence d'estradiol. L'immunsérum L 1258 est moins spécifique puisque la présence de petite quantité de E_1 ou E_2 modifie le résultat et ceci d'une façon relativement importante.

Enfin on peut voir qu'avec l'immunsérum de Caldwell, le déplacement de l'estriol radioactif par des quantités très faibles d'estrone ou d'estradiol est très important. En effet, 50 pg d'estradiol entraînent un déplacement correspondant en équivalent estriol à 300 pg.

4) - Etude de la stabilité des immunsérums et du système radio-immunologique.

Les immunsérums anti-estradiol-6-CMO-BSA (L 4386) et anti-estriol-6-CMO-BSA L 1258 ont été utilisés pendant plusieurs mois pour les dosages d'estrogènes.

La figure 7 montre les courbes pour l'estradiol et l'estriol construites en utilisant la moyenne des points obtenus pour les courbes standard réalisées depuis 7 mois. La déviation standard pour chacun de ces points est également indiquée. On peut observer la bonne stabilité de l'immunsérum au cours du temps. Cette constatation peut également s'appliquer à la méthode radio-immunologique elle-même. Les coefficients de variations obtenus pour chacun des points des courbes oscillent entre 2 et 10 %.

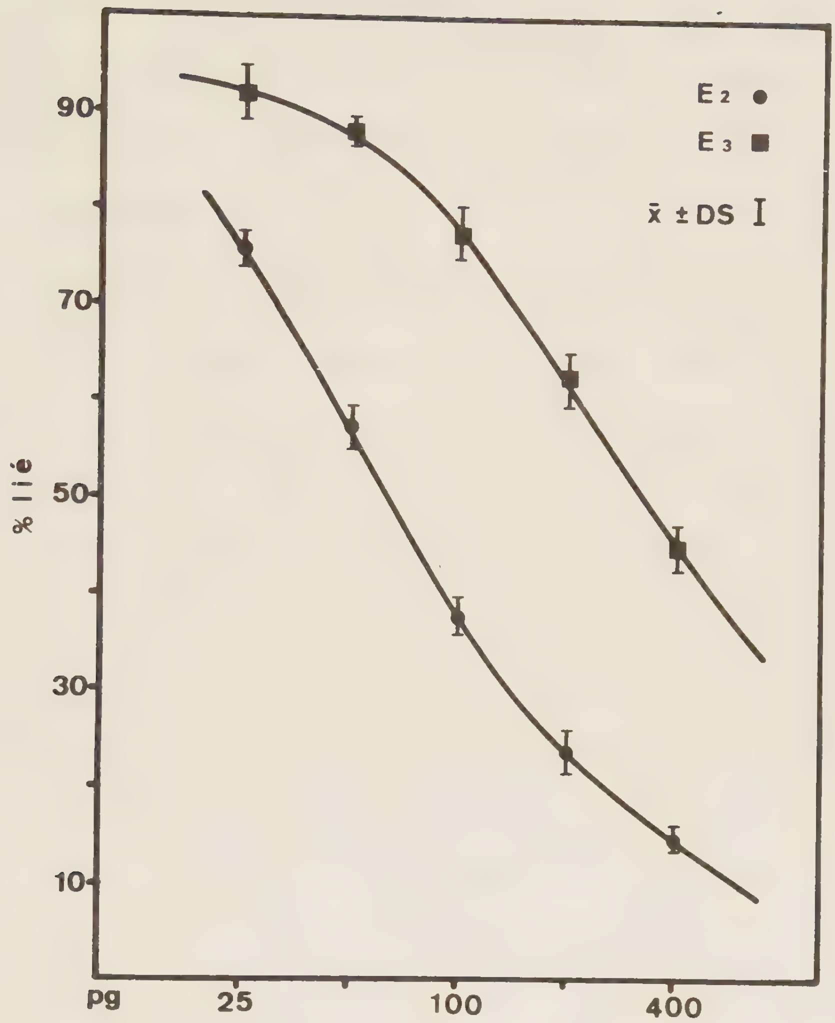


Figure 7 - Tracés moyens des courbes standard de l'estradiol et de l'estriol établies au cours de 7 mois de dosages radio-immunologiques avec les sérums anti-estradiol L 4386 et anti-estriol L 1258.

(Traceurs radioactifs - E_2-^3H 10.160 cpm ± 444, donnant 44 % ± 5,6 de liaison (point 100 % lié);
- E_3-^3H 10.000 cpm ± 763, donnant 50,7 % de liaison).

(Cf. Technique du dosage, page 194)

Discussion -

La discussion des méthodes utilisées pour la préparation et l'étude d'un immunsérum de haute spécificité comporte plusieurs aspects importants correspondant aux diverses étapes.

- Synthèse de l'antigène -

Le couplage de l'estradiol ou de l'estriol à l'albumine sérique de boeuf par l'intermédiaire d'une fonction (O-carboxy-méthyl)oxime en position 6 est simple à réaliser. La synthèse de l'oxime fournit un produit très pur avec un rendement de l'ordre de 95 %. Il semble que la synthèse en milieu sodique conduise à un seul isomère alors qu'en milieu pyridinique il s'en formerait deux (le produit obtenu présente en chromatographie en couche mince une tache de faible importance voisine du produit principal).

L'analyse de ces composés par spectrométrie de masse, R M N et infra-rouge a permis de confirmer leur structure. En particulier, nous avons retrouvé par spectrométrie de masse un pic correspondant à la perte du fragment (O CH_2 COOH) et par R M N un singulet, deux protons, correspondant au méthyle substitué de l'oxime.

Plusieurs macromolécules ont été proposées comme support antigénique pour les stéroïdes (l'albumine de boeuf, l'albumine humaine, l'hémocyanine, différents polypeptides de synthèse). Nous avons porté notre choix sur l'albumine sérique de boeuf. En effet, la BSA peut être obtenue à l'état très pur; elle présente un poids moléculaire élevé ($\simeq$ 70.000) et un contenu en résidu lysine bien défini (61).

Le nombre de molécules d'haptène fixées à la protéine porteuse joue un rôle important dans l'obtention d'un immunsérum actif et spécifique. Avec la méthode à l'anhydride mixte, nous avons pu coupler une trentaine de molécules de stéroïde par molécule de BSA. Ceci est un nombre relativement élevé compte tenu de l'accessibilité plus ou moins favorable d'un certain nombre de groupements $-NH_2$ libres de la BSA.

- Activité des immunsérums -

Les caractères antigéniques des composés ainsi préparés semblent satisfaisants. Après leur injection à différents animaux les immunsérums obtenus présentent dans l'ensemble une activité antistéroïde élevée (1/12.000 pour les sérums anti-estradiol,
1/8.000 pour les sérums anti-estriol).

Ces résultats se comparent favorablement à ceux décrits par d'autres auteurs pour différents sérums anti-stéroïdes.

En raison du petit nombre d'animaux utilisés et des variations individuelles, il est difficile de trouver des corrélations entre la réponse à l'immunisation et l'espèce animale. On peut observer pourtant que le porc semble très peu réactif à nos antigènes.

En ce qui concerne la technique d'immunisation, l'interprétation des résultats trouvés dans la littérature et ceux obtenus avec nos antigènes ne permet pas de définir un protocole privilégié. Cependant l'injection de rappel fréquente et la prolongation de l'immunisation au-delà du 3ème ou 6ème mois ne semble pas améliorer l'activité immunologique.

- Sensibilité -

La sensibilité d'un dosage radio-immunologique dépend de plusieurs facteurs :

1 - L'erreur de la détermination du pourcentage d'hormone marquée fixée aux anticorps en l'absence d'hormone froide.

2 - L'affinité de l'anticorps pour l'hormone.

3 - La quantité de l'hormone marquée ajoutée au milieu d'incubation.

4 - La dilution de l'antisérum.

Ceci se traduit en pratique, pour les conditions adoptées pour le dosage, par la plus petite quantité d'hormone induisant une différence significative du pourcentage de l'hormone marquée fixée aux anticorps. Le seuil de sensibilité est mis en évidence par la pente de la courbe standard aux faibles concentrations d'hormone froide.

Nous avons ainsi obtenu des sensibilités importantes, de l'ordre de 10 pg pour les immunsérums de lapin anti-estriol et anti-estradiol-6-CMO-BSA. La partie exploitable de la courbe va de 10 à 400 pg.

Les immunsérums provenant de la chèvre ou de la brebis se sont révélés être beaucoup moins sensibles (de l'ordre de 5 à 10 fois) mais la partie exploitable de la courbe va jusqu'à 700 ou 800 pg.

- Spécificité de l'immunsérum -

La spécificité de l'immunsérum semble dépendre en grande partie de la position de couplage de l'haptène à la BSA [113].

En effet, jusqu'en 1970, le couplage des stéroïdes à la protéine se faisait surtout par l'intermédiaire de leurs groupes

fonctionnels. Les immunsérums obtenus dans ces conditions présentent en général une grande spécificité vis-à-vis des stéroīdes ayant une structure identique à celle de la partie de l'haptène la plus éloignée du site de couplage.

Par contre, les immunsérums se lient facilement aux stéroīdes présentant une différence structurale avec l'haptène dans la zone de couplage. Par exemple, l'antisérum E_2-17β-BSA présente des réactions croisées avec l'estrone et l'estradiol-17α de 96 à 47% supérieures à celles données par l'antisérum [139] 17β-estradiol-3-BSA (67 et 30 %). De même l'immunsérum anti-estriol-16α,17β-dihémisuccinate-BSA préparé par GURPIDE et al [140] donne des réactions croisées très importantes (près de 100 %) pour l'estrone, l'estradiol, l'estriol, l'estriol-16α-glucuronide et l'estradiol-17-glucuronide. L'anti-sérum estriol-3-BSA de GROSS et al [141] est beaucoup plus spécifique. Cependant les résultats obtenus par KELLIE et al [125] ne confirment pas ce résultat. En effet, l'immunsérum préparé par cet auteur à partir de l'estradiol-17β-glucuronide-BSA présente des réactions croisées nulles avec l'estriol-17β-glucuronide, l'estradiol-16-céto-17β-glucuronide et autres composés voisins. Les réactions croisées de l'immunsérum avec l'estrone, l'estradiol et l'estriol sont en revanche non négligeables. On peut observer que le couplage de l'haptène à la protéine se faisant par l'intermédiaire de la copule glucidique, la position 17 du stéroīde se trouve assez dégagée de la protéine.

Pour obtenir un immunsérum de haute spécificité vis-à-vis d'un stéroīde donné, il est donc nécessaire de coupler celui-ci

(ou son dérivé) à la protéine de telle sorte que les éléments structuraux caractéristiques de l'haptène soient accessibles à la surface de la macromolécule porteuse. Il nous a semblé que la position 6 du phénolstéroïde répondait à cette condition. Les immunsérums que nous avons obtenus à partir des estradiol- et estriol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-BSA présentent une spécificité très élevée, largement supérieure à celle des antisérums 3,16 ou 17-BSA. Il faut remarquer en particulier qu'ils donnent des réactions croisées à peu près nulles avec l'isomère 17α de l'estradiol et les isomères de l'estriol. Ces résultats sont en concordance avec ceux décrits par d'autres auteurs (129, 132).

Malgré les faibles taux des réactions croisées obtenues, on peut faire certaines observations sur la réactivité des anti-sérums vis-à-vis de quelques phénolstéroïdes :

- L'immunsérum anti-estradiol de lapin présente une spécificité du même ordre que celui de chèvre. Il donne une réaction croisée supérieure à 1 % seulement avec le 16-céto-estradiol-17β (1,3 %), l'estrone (2 %) et l'estriol-16β,17β (5 %). L'anti-sérum C 825 donne des réactions croisées supérieures à 1 % avec le 2-méthoxy-estradiol (1,6 %), l'estrone (2 %) et le 16-épi-estriol (4 %).
- Pour les immunsérums anti-estriol, on peut noter avec le sérum de lapine L 1258 des réactions croisées supérieures à 1 % avec l'estriol-16β,17β (1,7 %), l'estradiol-17β (2,9 %), le 6-céto-estradiol (5,9 %) et la 16α-hydroxy-estrone (1,74 %).

Avec l'antisérum de chèvre B 2038, seuls l'estriol-16β,17β et

l'estradiol-17β donnent des réactions croisées voisines de 1 %. Avec l'immunsérum L 1244 nous n'obtenons de réactions croisées supérieures à 1 % avec aucun des stéroïdes étudiés.

En ce qui concerne l'affinité des immunsérums vis-à-vis de leurs haptènes ou des dérivés 6-céto, on peut faire les remarques suivantes :

- Le 6-céto-estradiol présente avec les immunsérums anti-E_2-6-CMO, une réaction croisée inférieure à 13 %. La fonction cétone en 6 perturbe donc la complémentarité des surfaces de liaison antigène-anticorps, alors que dans l'antigène initiateur des anticorps, cette position est masquée car elle sert au couplage de l'haptène à la protéine.
- Avec les immunsérums anti-estriol-6-CMO, les dérivés 6-céto et 6-CMO de l'estriol ont des affinités beaucoup plus grandes. Cependant celles-ci varient selon l'origine de l'immunsérum. La réaction croisée des dérivés 6-céto et 6-CMO est respectivement de 210 et 160 % avec le sérum de brebis et seulement de 57 et 47 % avec le sérum de lapine.

La détermination des réactions croisées par l'évaluation des quantités de stéroïdes étrangers déplaçant 50 % du traceur radioactif ne permet d'estimer que d'une façon imparfaite l'interaction éventuelle au cours d'un dosage, des différents stéroïdes contaminants. En effet, comme le montre la figure 4 , les courbes décrivant le déplacement du traceur estradiol radioactif par des quantités croissantes de stéroïdes étrangers ne suivent pas d'évolutions parallèles. D'autre part, des quantités minimes de certains stéroïdes

semblent bloquer des sites non spécifiques des protéines de l'immunsérum. Cela se traduit par une baisse de la quantité de traceur lié. Une fois ces sites bloqués, l'augmentation de la quantité de stéroīde étranger ne modifie plus sensiblement le pourcentage du traceur radioactif et la réaction croisée sera interprétée comme nulle.

Nous avons donc abordé le problème de la spécificité sous un autre aspect. En effet, l'un des buts que nous avons poursuivis en préparant des immunsérums anti-estradiol et anti-estriol était de disposer d'anticorps spécifiques permettant le dosage radio-immunologique de ces stéroīdes directement dans le milieu biologique en évitant leur fractionnement. Il est évident que pour arriver à un résultat satisfaisant les principaux estrogènes présents ne doivent pas perturber la liaison antisérum - stéroīde dosée. Nous avons donc étudié l'interaction éventuelle de quantités croissantes des principaux estrogènes sur le dosage d'une quantité fixe de l'estradiol ou de l'estriol.

Les résultats obtenus décrits dans les tableaux IV et V montrent qu'avec l'antisérum L 4386 une quantité d'estriol 64 fois supérieure à celle de l'estradiol ne perturbe pas d'une façon statistiquement appréciable le dosage de celui-ci. Des quantités d'estrone 8 fois supérieures apportent aux résultats du dosage de l'estradiol une erreur de 50 %. Avec l'immunsérum anti-estradiol de Caldwell, la présence d'une quantité d'estrone 4 fois plus faible que celle de l'estradiol entraîne une erreur de 20 %.

La comparaison du résultat des dosages de l'estradiol plasmatique avant et après fractionnement ne montre pas de variations sensibles et confirme ainsi la haute spécificité de l'immunsérum préparé.

La même méthode appliquée à l'immunsérum anti-estradiol-6-CMO L 1244 montre que l'estrone ou l'estradiol ne perturbent pas la liaison estriol-anticorps même pour des quantités 68 fois supérieures à celles de l'estriol. Par contre, avec l'immunsérum L 1258, 50 pg d'estradiol ajouté à 200 pg d'estriol entraîne une erreur de 25 % alors que la réaction croisée donnée par la méthode 1 n'est que de 0,5 %.

Cette interférence n'est pas proportionnelle. Elle est relativement plus élevée pour les petites quantités (50 pg d'estrone donnant un déplacement du traceur correspondant à celui donné par 50 pg d'estradiol; de même, 100 pg d'estrone correspondent à 70 pg d'estradiol et 3.200 pg d'estrone à 100 pg d'estradiol). Ces résultats confirment l'hypothèse émise précédemment.

Les différents immunsérums obtenus ont été utilisés pendant plusieurs mois pour effectuer des dosages de stéroïdes plasmatiques ou urinaires. Les courbes standard établies alors présentent peu de variations les unes par rapport aux autres et au cours du temps. Aucune dégradation de l'activité des immunsérums n'a pu être observée sur une période supérieure à 6 mois.

En conclusion, les immunsérums préparés à partir d'estradiol et d'estriol couplés à la B S A par leur position 6 présentent d'excellentes propriétés immunologiques : activité, sensibilité, spécificité. Avec les immunsérums L 4386 et L 1244, nous disposons d'antisérums de très haute spécificité vis-à-vis de l'estradiol et de l'estriol permettant d'envisager le dosage de ces phénolstéroïdes directement dans les milieux biologiques avec une bonne sécurité.

Chapitre II

APPLICATIONS BIOLOGIQUES

Excrétion urinaire des estrogènes non conjugués au cours du cycle, de la grossesse et après stimulation par HMG ou HCG.

L'hormone sécrétée par la thèque interne folliculaire et par la thèque lutéinisée du corps jaune est essentiellement l'estradiol, plus accessoirement l'estrone. La production des estrogènes par les ovaires est contrôlée par les hormones hypophysaires et présente un caractère cyclique.

L'estradiol agit sur tous les éléments de l'appareil génital femelle (muscle utérin, endomètre, muqueuse vaginale,...) ainsi que sur les glandes mammaires et d'une façon générale, sur le tissu conjonctif.

L'estradiol règle aussi le niveau des hormones hypophysaires qui contrôlent l'ovulation (effet "Feedback").

Au cours de la grossesse, la plus grande partie des estrogènes est d'origine placentaire. Le placenta ne disposant pas d'un équipement enzymatique complet, la synthèse des estrogènes se fait à partir des précurseurs immédiats androgènes. Le placenta peut synthétiser directement l'estriol à partir de la $3\beta,16\alpha$-androsta-5-ène,3-one provenant du foie foetal. Le transport des estrogènes de l'organe sécréteur à l'organe cible se fait essentiellement par le sang.

En dehors de la grossesse, l'estrone et l'estradiol qui s'interconvertissent sont les principaux estrogènes circulant à l'état libre. L'estrone, l'estradiol et la quasi-totalité de l'estriol se trouvent également à l'état conjugué. Après avoir agi sur les récepteurs, les estrogènes subissent, dans le foie, des modifications métaboliques qui aboutissent à leur inactivation plus ou moins complète puis à leur élimination.

Ce catabolisme essentiellement hépathique se fait à partir de l'estrone par l'intermédiaire d'un grand nombre d'hydroxylases et d'hydroxystéroīdes déshydrogénases. Après conjugaison des métabolites à l'acide sulfurique et à l'acide glucuronique, les estrogènes sont excrétés pour leur plus grande partie dans les urines.

La connaissance de la concentration plasmatique estrogénique ou la mesure des métabolites d'excrétion urinaire permet une estimation plus ou moins directe de la sécrétion glandulaire.

Chez la femme normale, au cours du cycle, on observe, au moment de l'ovulation, une augmentation brutale suivie d'une chute abrupte du taux des estrogènes plasmatiques et urinaires. Ce "pic ovulatoire" présente un reflet de la sécrétion du follicule de de Graaf.

Au cours de la phase lutéale, du 14ème au 28ème jour, on observe une remontée du taux des estrogènes (élévation plus étalée et moins intense) qui se maintient en plateau puis les estrogènes diminuent avant l'apparition des règles suivantes. Le taux des estrogènes reflète ici l'activité du corps jaune.

Au cours de la grossesse, les estrogènes urinaires proviennent du corps jaune gestatif pendant les six semaines suivant la fécondation et, au-delà, du placenta qui secrète dans la circulation maternelle des quantités croissantes d'estriol. Dans le plasma, ce sont l'estrone et l'estradiol que l'on trouve à l'état libre pendant la phase dite ovarienne. Ceci montre l'intérêt du dosage des estrogènes plasmatiques ou urinaires.

Comme nous l'avons vu précédemment, les estrogènes urinaires sont excrétés sous la forme soluble de glucuronides ou de sulfates. Cependant, à la suite de COHEN [143], quelques auteurs ont observé la présence d'estrogènes libres dans les urines de femmes en fin de grossesse [143 à 146]. JAYLE et al [147] ont noté un taux d'excrétion d'environ 0,5 % par rapport aux estrogènes totaux et ont donné les proportions relatives d'estrone, d'estradiol et d'estriol.

Plus récemment, O.W. SMITH [148] a dosé l'estrone et l'estriol non conjugués de l'urine d'une femme en fin de grossesse possèdant des taux inhabituellement élevés. Il a ainsi établi chez cette femme le rapport du taux de l'estrone et de l'estriol libres urinaires sur le taux du stéroïde correspondant, présent dans le plasma.

ERIKSSON et GUSTAFSSON [149] ont trouvé chez une femme à la 37ème semaine de gestation (7,4 mg d'estriol libre). Cependant, les méthodes d'analyse dont on disposait jusqu'à ces derniers temps n'étaient pas assez sensibles pour pouvoir faire des études systématiques sur les quantités d'estrone, d'estradiol et d'estriol libres excrétées dans l'urine humaine au début ou en dehors de la grossesse. Avec les méthodes de dosage radio-immunologiques,

maintenant bien au point, nous disposons de procédés permettant d'effectuer le dosage de quelques dizaines de picogrammes seulement. C'est ainsi que J. LONGCHAMPT et al.[150] ont effectué le dosage de l'estradiol libre directement sur l'extrait urinaire en utilisant un antisérum spécifique de l'estradiol, Nous avons également employé la méthode radio-immunologique pour effectuer une étude systématique des taux d'estrone, d'estradiol et d'estriol non conjugués, excrétés dans l'urine de femmes au cours du cycle, de la grossesse et après stimulation par HMG ou HCG [151]. Dans le travail présenté ici, nous faisons cette étude en comparant les taux des estrogènes libres urinaires à ceux des estrogènes conjugués et des estrogènes libres plasmatiques.

MATERIEL ET METHODES

- Sujets -

Les urines de 12 heures de nuit proviennent :

- de 3 femmes normales au cours du cycle,
- de 9 femmes au cours de la grossesse,
- de 29 femmes traitées pour stérilité primaire ou secondaire.

Pour le traitement par HMG, des injections de 3 ampoules de 75 u. IRP_2 sont effectuées le 6ème, le 9ème et le 12ème jours après les règles. Les urines sont prélevées après la 3ème injection.

Dans le cas du traitement par HCG, des injections de 5.000 U.I. sont effectuées le 3ème, le 5ème et le 7ème jours après le décalage thermique et les urines prélevées le 8ème jour. Les dosages plasmatiques sont faits à partir du sang hépariné centrifugé.

- Réactifs et solvants-

Estrone-6-7 ^3H (30 à 50 c/mmol.), estradiol-2,4,6,7 ^3H (110 c/mmol.), estriol-6,7 ^3H (40 c/mmol.) N.E.N. Chemical. Les stéroïdes sont utilisés tels quels après contrôle de leur pureté sur chromatoplaque.

o Estrone, estradiol et estriol - Roussel UCLAF.

Pour servir de témoin de récupération, le stéroïde tritié est purifié sur colonne de Sephadex LH 20.

o Pour le dosage de l'estrone, nous utilisons de l'immunsérum-antiestradiol, que nous a obligeamment fourni le Docteur Caldwell, provenant de l'immunisation de lapine par l'estradiol-17-hémisuccinate couplé à l'albumine de boeuf (BSA) à la dilution de 1/16.000 dans le tampon.

o Pour le dosage de l'estradiol, nous utilisons soit l'anti-sérum de Caldwell, soit l'antisérum L 4386 obtenu par immunisation de lapine par l'estradiol-6-(O-carboxyméthyl)oxime couplé à la B S A (Chapitre I) à la dilution de 1/17.000.

o Les dilutions sont celles donnant environ 40 à 50 % de liaison avec le traceur radioactif.

o Pour le dosage de l'estriol, nous utilisons l'anti-sérum L 1258 obtenu par immunisation de lapine par l'estriol-6-(O-carboxyméthyl)oxime-B S A (Chapitre I) à la dilution de 1/1.000.

o L'acétate d'éthyle (R.P. Prolabo) est redistillé juste avant l'emploi.

o Le cyclo-hexane, le benzène, le méthanol (provenance Merck) sont utilisés sans autre purification.

Les autres produits utilisés sont :

- phosphate monosodique 1 H_2O et phosphate disodique 12 H_2O (Merck)
- chlorure de sodium (R.P. Prolabo)
- azide de sodium (Touzart et Matignon)
- norit A Prolabo
- dextran T.

L'incubation est faite dans des tubes polyéthylène à hémolyse de 7:13 mm.

La solution tampon pH 7 à 0,1 % de gélatine et la suspension de charbon sont préparées selon CHUNG (138).

La solution de scintillation employée est le mélange de "Bray". (152)

- Mode opératoire -

La méthode radio-immunologique utilisée dérive de celle décrite par H.W. CHUNG.

1) Extraction

Les urines de 12 heures de nuit sont recueillies sur antiseptique et acididiées si nécessaire. Elles sont soit utilisées immédiatement, soit mises à congeler.

L'extraction des estrogènes est effectuée avec 25 ml du mélange acétate d'éthyle-cyclohexane 50 : 50 sur des volumes d'urine variant de 2 à 15 ml suivant les cas.

Auparavant, des quantités connues de traceurs radioactifs témoins (environ 2.400 dpm) sont ajoutées à chaque urine.

Après 1 heure d'agitation, la phase organique est décantée et concentrée à sec.

L'extraction des estrogènes plasmatiques est effectuée sur des volumes de plasma de l'ordre de 0,2 à 2 ml avec 5 ml du mélange acétate d'éthyle:cyclohexane 50 : 50. Les deux phases liquides sont agitées énergiquement pendant 5 minutes puis la phase organique est

recueillies avec une pipette Pasteur.

2) Fractionnement

L'estrone, l'estradiol et l'estriol sont séparés les uns des autres par passage sur colonne de Sephadex LH 20 selon la méthode décrite par CHUNG (138).

3) Dosage radio-immunologique

L'extrait sec purifié est repris par un volume de solution tampon tel que la quantité de stéroïde phénolique présumée, se trouvant dans 200 µl, se situe dans la gamme de 25 à 400 pg.

Des volumes de 100 et 200 µl de cette solution sont déposés dans quatre tubes à hémolyse. Un aliquot correspondant au 1/5è de la solution initiale est déposé dans une fiole de comptage en vue de l'étude de la récupération afin de calculer les pertes.

A partir d'une solution de stéroïde standard contenant 4 ng par ml de tampon phosphate, on prépare par dilutions successives une gamme pour la courbe standard allant de 25 à 400 pg. Ces solutions sont déposées dans des tubes à hémolyse en plastique.

Un blanc solvant, passé sur colonne (correspondant à un blanc colonne simulé) est distribué dans certains tubes de telle sorte que tous les tubes du dosage contiennent la même proportion de contaminant éventuel.

Le volume de tampon phosphate se trouvant dans les tubes est alors ajusté à 200 µl. Après distribution des solutions d'anti-sérum et de traceurs radioactifs, l'incubation est effectuée à 4° pendant deux heures et demie.

Après distribution d'un ml de suspension de charbon, les tubes sont laissés 15 minutes puis centrifugés à 2.500 R P M pendant 10 minutes. Toutes ces opérations sont effectuées à 4°.

Le surnageant contenant le stéroïde lié à l'anticorps est alors décanté dans une fiole de comptage puis, après addition de 10 ml de solution de "Bray", le comptage de la radioactivité est fait dans un compteur à scintillation intertechnique SL 30.

RESULTATS

1) Etude de la stabilité du taux des estrogènes libres dans l'urine jusqu'à 24 heures suivant l'émission.

Les urines de 12 heures de nuit provenant de trois sujets et ayant des pH différents sont recueillies sur antiseptique puis conservées 24 heures à la température de la pièce.

Des fractions de ces urines sont prélevées à différents intervalles, soumises à une extraction et dosées. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau X . Chaque point représente la moyenne de deux dosages.

TABLEAU X

ETUDE DE LA VARIATION DES TAUX D'ESTROGENES LIBRES DANS DES URINES EN FONCTION DU TEMPS DE CONSERVATION DE CELLES-CI. En ng/24 heures.

Temps entre la dernière émission et le dosage	Urine 1 pH 5,1		Urine 2 pH 5,7		Urine 3 pH 5,9		
	E_1	E_2	E_1	E_2	E_1	E_2	E_3
3 h	-	-	270	94	43	16	50
4 h	127	60	-	-	-	-	-
5 h			270	110	32	14	60
7 h	129	64	300	116	63	16	66
12 h	138	62	-	-	-	-	-
26 h	180	71	290	96	74	16	67

E_1 = Estrone E_2 = Estradiol E_3 = Estriol

D'après ces résultats, l'hydrolyse spontanée des conjugués peut être considérée comme minime surtout si l'on pratique l'extraction dans les 5 heures suivant l'émission des urines de 12 heures de nuit.

2) Etude du taux d'excrétion urinaire de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol libres au cours du cycle menstruel de la femme.

Cette étude a été faite sur trois cycles de femmes normales.

Le tableau XI indique les valeurs extrêmes d'estrone, d'estradiol et d'estriol libres trouvés dans l'urine au cours de ces trois cycles.

Le tableau XII donne les rapports E_1/E_2 et $E_3/E_2 + E_1$, la déviation standard et le coefficient de variation de cette moyenne, ainsi que le rapport estrogènes conjugués totaux sur estrogènes libres totaux.

TABLEAU XI

VALEURS EXTREMES DES TAUX D'EXCRETION DES TROIS ESTROGENES LIBRES URINAIRES AU COURS DU CYCLE (En ng/24 heures).

	Estrogènes totaux		Estrone		Estradiol		Estriol	
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.
Mme D	150	750	37	290	17	70	98	470
Mme M	205	710	57	350	24	110	72	270
Mme E	80	370	24	220	18	50	25	100
Moyenne	145	610	43	290	20	76	65	280

TABLEAU XII

MOYENNE DES RAPPORTS : ESTRONE/ESTRADIOL; ESTRIOL/ESTRONE + ESTRADIOL; ESTROGENES TOTAUX CONJUGUES/ESTROGENES TOTAUX LIBRES.

Déviation standard et coefficient de variation de ces moyennes

	E_1/E_2	DS	CV	E_3/E_2+E_1	DS	CV	ETC/ETL	DS	CV
Mme M	4,1	± 0,8	18%	0,5	± 0,1	21%	72	± 22	30%
Mme D	3,4	± 0,8	24%	1,8	± 0,75	41%			
Mme E	4,1	± 0,7	16%	0,4	± 0,1	28%			
Moyenne	3,9	± 0,8	19%	0,9	± 0,31	29%			

ETC = Estrogènes totaux conjugués

ETL = Estrogènes totaux libres

DS = Déviation standard calculée selon la formule : $\sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$

CV = Coefficient de variation : DS/m (m = moyenne).

Au cours du cycle, la quantité d'estrone, d'estradiol et d'estriol libres éliminés dans l'urine varie de 150 à 600 ng/24 h. en moyenne (Tableau XI).

Chez un même sujet, la variation des taux individuels de ces composés évolue dans un même sens et leurs rapports restent relativement stables.

D'un sujet à l'autre, le rapport E_1/E_3 peut s'inverser tandis que la proportion d'estradiol libre éliminée reste toujours inférieure à celle des autres estrogènes . Le rapport E_1/E_2 est en moyenne de 4, tandis que celui de $E_3/E_2+ E_1$ est de 0,9. Au cours d'un cycle pour lequel le dosage des estrogènes conjugués a été fait, nous avons obtenu un rapport moyen estrogènes conjugués/estrogènes libres voisin de 72 (Tableau XII).

La figure 8 montre les variations des taux d'excrétion de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol en comparaison avec ceux des estrogènes conjugués au cours d'un même cycle. Nous pouvons observer une certaine similitude des courbes. Cependant les tracés concernant les estrogènes libres présentent quelques différences avec celui des estrogènes conjugués. Dans les quatre cas suivis régulièrement, nous trouvons une augmentation importante des estrogènes libres à la fin de la phase lutéale avant la chute prémenstruelle.

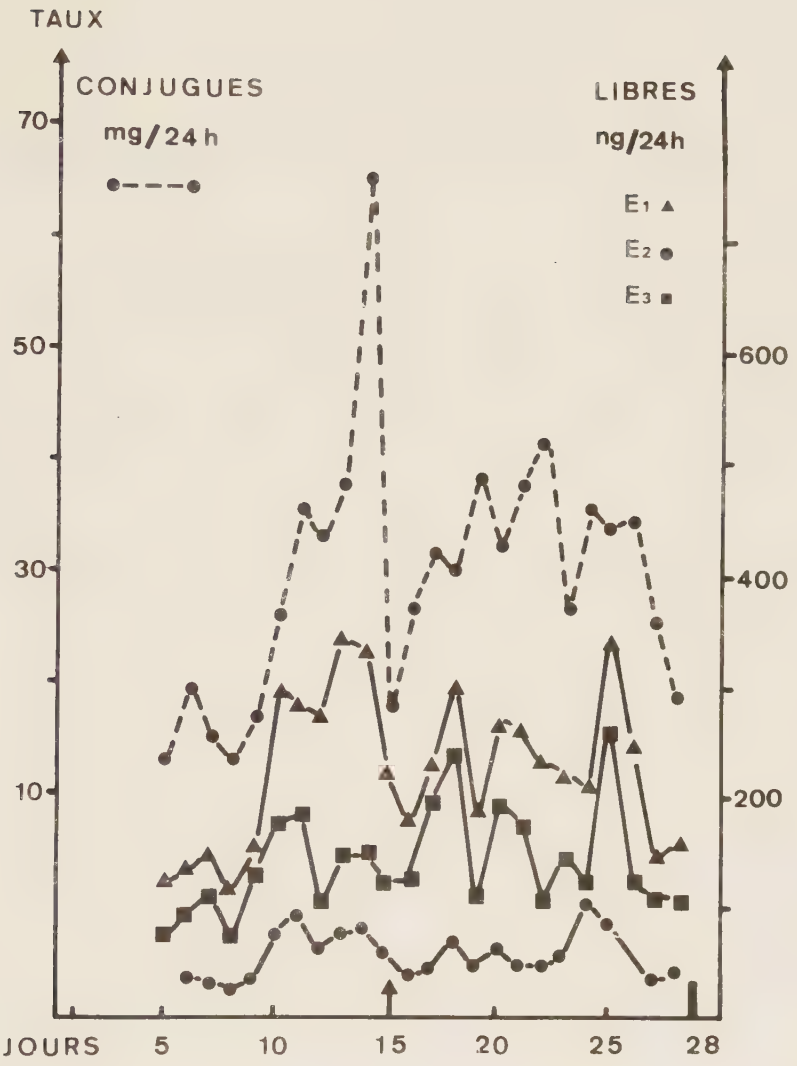


Figure 8 - Taux d'excrétion de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol libres urinaires et des estrogènes totaux conjugués au cours du cycle.

(Chaque point représente la moyenne des résultats de 2 dosages).

Le tableau XIII indique les taux moyens des estrogènes plasmatiques chez la femme au cours du cycle.

TABLEAU XIII

ESTROGENES PLASMATIQUES AU COURS DU CYCLE - RAPPORT E_1/E_2

Phase du cycle	E_1 pg/ml	E_2 pg/ml	E_3 pg/ml	E_1/E_2
Phase folliculaire	65	105	< 25	0,62
Phase lutéale	157	257	< 25	0,61
Phase ovulatoire		506	< 25	

Ces chiffres montrent la prédominance de l'estradiol dans le plasma et la forte poussée de la sécrétion au moment de l'ovulation. Les taux de l'estriol sont à la limite de la précision de la méthode.

3) Excrétion urinaire des estrogènes libres au cours de la grossesse.

Le tableau XIV montre l'évolution des taux d'élimination des estrogènes libres au cours de la grossesse ainsi que les proportions relatives d'estrone, d'estradiol et d'estriol.

Le tableau X V indique l'évolution des taux des estrogènes libres plasmatiques au cours de la grossesse ainsi que celui des estrogènes conjugués totaux urinaires chez les mêmes sujets. Il présente également les rapports estrone/estradiol, estradiol/estriol et estriol/estrone + estradiol.

La figure 9 schématise quelques-uns de ces résultats.

TABLEAU XIV

EVOLUTION DES TAUX D'EXCRETION DES ESTROGENES LIBRES URINAIRES AU COURS DE LA GROSSESSE (en ng/24 heures).
Rapports : E_1/E_3; E_1/E_2 et $E_3/E_1 + E_2$
(Moyenne obtenue pour environ 5 échantillons par point).

Semaines de grossesse	T	E_1	E_2	E_3	E_1/E_3	E_1/E_2	E_3/E_2+E_1
5 - 10	1.790	680	270	840	0,82	2,5	0,88
11 - 15	10.390	3.630	830	5.910	0,61	4,2	1,3
16 - 20	25.315	6.130	1.890	17.300	0,35	3,2	2,1
21 - 25	58.400	21.500	3.500	33.500	0,64	6,1	1,3
26 - 30			4.450	35.700			
31 - 35	74.100	15.300	5.100	53.700	0,28	3	2,6
36 - 40	134.350	27.600	6.700	100.000	0,28	4	2,9
Taux de progression de la 10è à la 40è semaine	75	40	24	120			
				Moyenne		3,8	

TABLEAU **X V**

EVOLUTION DES TAUX DES ESTROGENES LIBRES PLASMATIQUES ET DES ESTROGENES CONJUGUES URINAIRES AU COURS DE LA GROSSESSE -
Rapports des estrogènes plasmatiques : E_1/E_2; E_2/E_3 et E_3/E_2+E_1
(Moyenne des dosages pour 5 à 10 échantillons par point).

Semaines	Conjugués urinaires ng/24 h	Estrogènes plasmatiques en pg/ml E_1	E_2	E_3	E_1/E_2	E_2/E_3	E_3/E_2+E_1
1 - 5	138	413	409	.	1		
6 -10	408	491	1.077	75	0,46		
11 -15	879	1.427	3.643	594	0,39	6,1	0,12
16 -20	3.705	3.492	6.715	1.817	0,52	3,7	0,18
21 -25	11.612	6.023	11.193	4.471	0,54	2,5	0,26
26 -30	16.840	5.071	19.531	5.361	0,26	3,6	0,22
31 -35	21.757	5.528	18.699	5.118	0,29	3,6	0,21
36 -40	32.922	7.502	24.094	10.721	0,31	2,2	0,34
progression*	81	15	22	143			

*Progression des 6ème-10ème semaines aux 36ème-40ème semaines.

Nous pouvons observer d'après les chiffres indiqués sur ce tableau que le taux d'excrétion de l'estriol libre au cours de la grossesse augmente 120 fois entre la 10ème et la 40ème semaines alors que pour l'estradiol et l'estrone cette progression n'est respectivement que de 24 et 40 fois. En fin de grossesse, on trouve dans l'urine près de 100 µg d'estriol, 28 µg d'estrone et 6 à 7 µg d'estradiol.

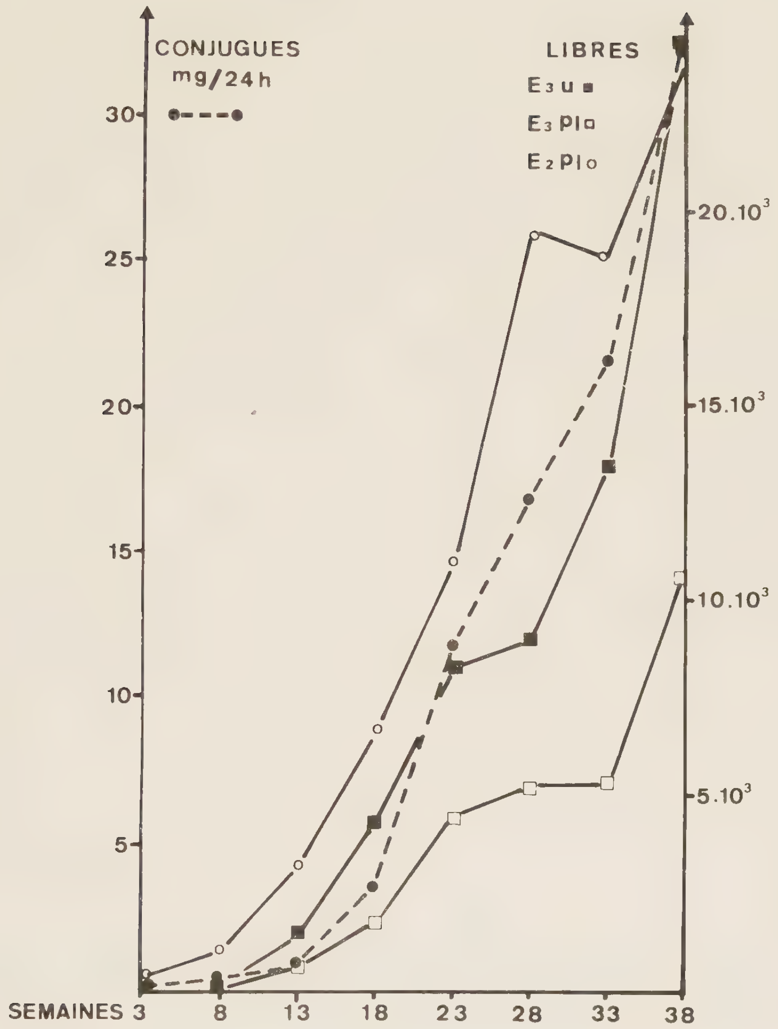


Figure **9** - Taux moyen des estrogènes au cours de la grossesse

E_3u = Estriol libre urinaire ng/24 h -

E_2 et E_3 libres plasmatiques pg/ml.

De la 5ème à la 10ème semaine , nous obtenons déjà pour chacun des trois estrogènes des valeurs environ 2 fois plus élevées que celles correspondant au pic ovulatoire d'un cycle normal (Cf. tableau XIV).

Les taux des estrogènes libres plasmatiques et des estrogènes conjugués urinaires présentent des augmentations du même ordre entre la 6ème et la 40ème semaine de la grossesse. Cependant il faut noter que la concentration plasmatique de l'estrone n'augmente que d'environ 15 fois au cours de cette période. De même, comme le montre la figure 9 , les taux plasmatiques des estrogènes présentent un palier entre la 23ème et la 33ème semaine pour l'estriol et entre la 28ème et la 33ème semaine pour l'estradiol.

Chez une même femme, nous avons pu mesurer les taux des estrogènes au cours d'un cycle précédent une grossesse. Le tableau XVI indique les valeurs observées à différentes époques du cycle et au début de la grossesse.

TABLEAU XVI

VARIATION CHEZ UN SUJET DES TAUX D'ELIMINATION DES ESTROGENES LIBRES AU COURS D'UN CYCLE SUIVI DE MENSTRUATION ET D'UN CYCLE SUIVI DE GROSSESSE (En ng/24 h) -

Nombre de jours après les dernières règles.	E_1	E_2	E_3	Totaux
<u>1er cycle 32 jours</u>				
15	80	20	140	240
19	290	69	390	750
24	165	45	310	520
26	90	27	190	310
<u>Grossesse</u>				
26	120	34	140	300
32	280	71	380	730
39	280	74	380	740

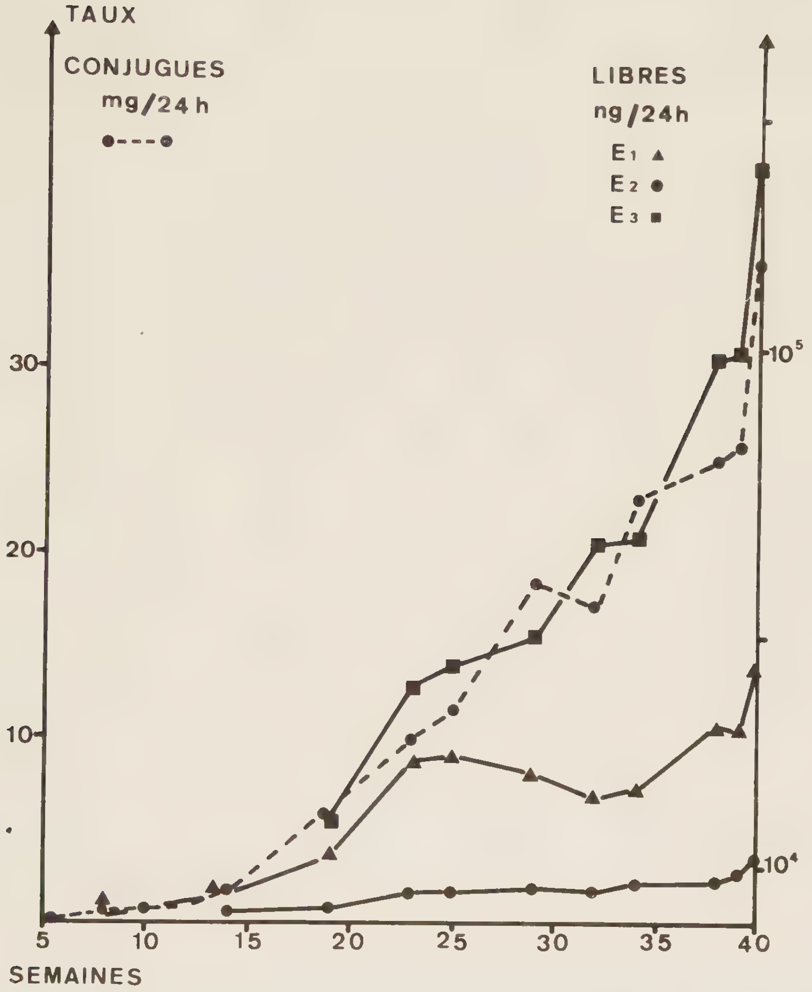


Figure 10 - Elimination des estrogènes urinaires libres ou conjugués au cours d'une grossesse (Mme P)

(Chaque point représente la moyenne des résultats de 2 à 4 dosages).

Au cours du cycle présenté partiellement dans le tableau XVI le pic ovulatoire se situe aux environs du 19ème jour après les règles précédentes. Dès le 26ème jour, s'amorce la chute des taux des estrogènes libres urinaires. Nous observons alors le palier de faible excrétion, d'importance analogue à celui obtenu pendant les 15 premiers jours du cycle.

Dans le cas de fécondation de l'ovule, cette chute du 26ème jour a également lieu mais elle est de moindre importance. Au 32ème jour (date des régles présumées), le taux des estrogènes atteint déjà une valeur analogue à celle du pic ovulatoire.

Sur la figure 10 , nous avons représenté simultanément les taux d'excrétion des trois estrogènes libres et ceux des estrogènes conjugués totaux obtenus chez un sujet au cours d'une grossesse normale. Nous pouvons observer que la courbe obtenue pour l'estriol évolue d'une façon similaire à celle des estrogènes conjugués. Par contre, les taux d'élimination de l'estrone et de l'estradiol demeurent stationnaires ou régressent légèrement entre la 22ème et la 34ème semaine...

4) <u>Excrétion urinaire des estrogènes libres après stimulation par HMG ou HCG.</u>

Les tableaux XVII et XVIII indiquent les quantités d'estrone, d'estradiol et d'estriol présentes dans l'urine de femmes ayant subi un traitement par HMG ou HCG. Nous avons également porté sur ces tableaux les valeurs des estrogènes conjugués obtenues par une méthode fluorimétrique, celle des estrogènes libres plasmatiques, ainsi que les rapports des estrogènes libres E_1/E_2 et $E_3/E_1 + E_2$.

TABLEAU X VII

MOYENNE DES TAUX D'EXCRETION URINAIRE DE L'ESTRONE, L'ESTRADIOL, L'ESTRIOL LIBRES URINAIRES, DES ESTROGENES CONJUGUES ET DES TAUX DE L'ESTRONE ET DE L'ESTRADIOL LIBRES PLASMATIQUES, CHEZ DES FEMMES APRES STIMULATION PAR HMG (13 CAS).

Rapports : E_1/E_2 et $E_3/E_1 + E_2$ des estrogènes urinaires.

Déviation standard et coefficient de variation.

	ETC µg/24 h	ETL ng/24 h	E_1 p* pg/ml	E_2 p pg/ml	E_1 ng/24 h	E_2 ng/24 h	E_3 ng/24 h	E_1/E_2	E_3/E_2+E_1
m	40	914	287	522	530	149	273	3,68	0,477
D S	± 21	± 600	± 140	± 301	± 345	± 104	± 201	± 1,29	± 0,32
C V	52	66%	49%	58%	65%	70%	74%	35%	67%

* 7 cas seulement

m = moyenne D S = déviation standard C V = coefficient de variation

E_1p - E_2p = Estrone et estradiol libres plasmatiques.

TABLEAU XVIII

MOYENNE DES TAUX D'EXCRETION URINAIRE DE L'ESTRONE, L'ESTRADIOL, L'ESTRIOL LIBRES; DES ESTROGENES CONJUGUES ET DES TAUX D'ESTRADIOL LIBRE PLASMATIQUE, CHEZ DES FEMMES APRES STIMULATION PAR HCG (16 CAS).

Rapport E_1/E_2 et E_3/E_2+E_1 des estrogènes urinaires. Déviation standard et coefficient de variation.

	ETC µg/24 h	ETL* ng/24 h	E_2p pg/ml	E_1 ng/24 h	E_2 ng/24 h	E_3* ng/24 h	E_1/E_2	E_3/E_2+E_1*
m	67	1.110	332	419	120	431	3,68	0,65
D S	± 28	± 336	± 213	±221	± 57	±182	± 1,31	± 0,22
C V	42%	30%	64%	53%	47%	42%	36%	34%

Abréviations cf. page 107

* 8 Cas seulement.

On peut constater d'après les tableaux xvi à xvii que les femmes traitées par HMG ou HCG présentent dans leurs urines des taux d'estrogènes libres largement supérieurs à ceux que l'on peut constater au cours d'un cycle normal. Les déviations standard obtenues sont beaucoup plus importantes dans l'étude des urines de femmes traitées par HMG que dans celles des femmes stimulées par HCG. Dans les deux traitements, les taux moyens obtenus sont voisins alors que pour les estrogènes conjugués, les chiffres trouvés sont près de deux fois plus élevés dans le traitement par HCG. Les rapports E_1/E_2 et $E_3/E_2 + E_1$ sont analogues à ceux observés au cours du cycle normal.

DISCUSSION

o En plus de sa simplicité, la méthode de dosage radio-immunologique permet par sa sensibilité de doser des quantités de stéroïdes de l'ordre de quelques dizaines de picogrammes.

L'emploi d'immunsérums de haute spécificité, ajouté au fractionnement de l'extrait biologique sur colonne de Sephadex, permet d'éviter l'interférence de nombreux contaminants.

o Il ne semble pas que les estrogènes libres urinaires proviennent d'une hydrolyse spontanée des conjugués; en effet, nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation significative du taux des estrogènes libres dans l'urine au cours des 24 heures suivant leur émission.

o Au cours du cycle chez la femme, la somme des trois estrogènes libres étudiés représente environ 1 à 2 % des estrogènes totaux excrétés dans l'urine. Le rapport E_1/E_2 est assez constant

alors que le rapport $E_3/E_2 + E_1$ varie d'un sujet à l'autre. Ces constatations rejoignent celles faites par la plupart des auteurs pour les estrogènes conjugués. Cependant, dans la majorité des cas étudiés au cours du cycle normal comme après stimulation, nous avons observé une excrétion urinaire moyenne de l'estrone, supérieure à celle de l'estriol.

o Le profil de l'excrétion des estrogènes libres urinaires au cours du cycle est relativement proche de celui obtenu pour les estrogènes conjugués (Figure 8). Cependant, nous avons observé dans tous les cycles étudiés un pic en fin de phase lutéale analogue à celui du pic ovulatoire. On peut se demander si ce taux élevé des estrogènes libres ne joue pas un rôle dans le déterminisme de la menstruation. MIKHAIL et al [153] ont observé également pour l'estradiol plasmatique au cours du cycle un pic en phase lutéale de même amplitude que le pic ovulatoire. Ce phénomène ne s'observe pas pour les estrogènes conjugués urinaires. Si la concentration des estrogènes au cours du cycle suit une évolution analogue, la répartition des estrogènes libres est très différente dans le plasma et dans les urines. Dans le plasma, l'estradiol est l'estrogène prédominant ($E_1/E_2 = 0,60$)alors que dans l'urine, c'est l'estrone ($E_1/E_2 = 4$). On peut observer cependant que dans le plasma, la plus grande partie de l'estradiol non conjugué est liée à une protéine (S B G) alors que cette dernière n'a qu'une affinité très faible pour l'estrone et l'estriol. Ceci explique probablement l'élimination plus importante de l'estrone. De même, on ne trouve que de faibles quantités d'estriol dans le plasma alors que dans l'urine, le taux est proche de celui de l'estrone, ce qui implique une clearance

plus élevée pour l'estriol que pour l'estrone.

Pendant les derniers jours du cycle, les taux des trois estrogènes diminuent progressivement et rejoignent les taux faibles du début de la phase folliculaire. Dans le cas où l'ovule est fécondé, cette chute est amorcée puis très rapidement enrayée. A l'époque des règles absentes, c'est-à-dire à l'époque où les gonadotrophines chorioniques sont sécrétées par le trophoblaste, les taux des estrogènes excrétés sont comparables à ceux de l'ovulation (tableau XVI). Cette manifestation précoce de la grossesse est également observable avec les estrogènes conjugués [154] Cette excrétion est un reflet de la stimulation des cellules thécales lutéinisées du corps jaune gestatif.

o Au cours de la grossesse, les estrogènes libres représentent 0,5 à 1 % du total des estrogènes excrétés. L'évolution de l'élimination respective de l'estrone, de l'estradiol et de l'estriol en fonction de l'âge de la grossesse est analogue à celle observée par Jayle et Crépy pour les conjugués [155]. En effet, on constate un taux d'excrétion de l'estriol en progression lente de la 4ème à la 12ème semaine puis accélération jusqu'à la 22ème semaine. Après un plateau de quelques semaines, le rythme s'accélère à nouveau jusqu'à la 40ème semaine. En fin de grossesse, on trouve 400 à 500 fois plus d'estriol qu'en phase lutéale. L'excrétion de l'estrone suit une progression parallèle jusqu'à la 24ème semaine puis reste relativement stable jusqu'à la fin où l'on note une brusque élévation vers la 40ème semaine. ADLERCREUTZ et LUUKKAINEN[156] ont observé une évolution analogue pour l'estrone conjuguée.

Le taux d'excrétion de l'estradiol progresse régulièrement au cours de la grossesse mais beaucoup plus faiblement, 2 fois moins vite que celui de l'estrone et 5 fois moins vite que celui de l'estriol.

En fin de grossesse, les proportions relatives d'estrone, d'estradiol et d'estriol libres que nous avons obtenues (E_1 = 20 %, E_2 = 5 %, E_3 = 74 %) sont tout à fait comparables à celles indiquées par JAYLE et al [147] (respectivement 24, 7 et 69 %).

Nous avons obtenu pour les estrogènes plasmatiques des résultats voisins de ceux décrits dans la littérature. L'estradiol reste toujours l'estrogène le plus abondant. Cependant l'estriol, grâce à sa production placentaire, présente la progression la plus élevée entre la 6ème et la 40ème semaines (143 fois). A la 40ème semaine, sa concentration représente 25 % de la quantité totale des trois estrogènes (E_1, E_2, E_3), alors que dans l'urine, l'estriol non conjugué participe pour 75 % à la somme des estrogènes libres. La progression des taux d'estradiol et d'estriol libres plasmatiques et urinaires suit une évolution similaire (respectivement 22 et 140 fois pour les estrogènes plasmatiques, 24 et 120 fois pour les estrogènes urinaires).

o Chez les femmes stimulées par HMG et HCG, nous trouvons des taux moyens de réponse des estrogènes libres urinaires largement supérieurs aux maxima observés au cours du cycle. Ces taux sont similaires dans les deux traitements. Cependant, il n'est pas sans intérêt de noter le taux élevé de l'estriol libre urinaire chez les femmes stimulées par HCG.

On trouve également des réponses positives, quoique moins importantes, pour les estrogènes libres plasmatiques. Par contre, pour les estrogènes urinaires conjugués, nous n'obtenons une réponse moyenne positive qu'après stimulation par HCG. Le pourcentage des estrogènes urinaires libres par rapport aux estrogènes totaux est de 1,6 % après traitement par HCG et de 2,3 % après celui par HMG.

CONCLUSION

Le dosage des estrogènes non conjugués de l'urine permet une bonne appréciation de l'activité physiologique de la femme. Les proportions relatives des trois principaux estrogènes libres éliminés dans l'urine reflètent davantage les taux d'excrétion des estrogènes conjugués que celui des estrogènes libres plasmatiques. Nous avons pu cependant mettre en évidence un certain nombre de relations entre les taux des estrogènes libres plasmatiques et urinaires. Les résultats nous encouragent à poursuivre cette étude.

CONCLUSION

Tout au long de ce travail concernant les estrogènes, nous nous sommes efforcés dans un but analytique et physiologique de nous attacher à trois aspects :

- Synthèse
- Identification et fractionnement
- Détermination quantitative par des méthodes ultra-sensibles.

Le premier point (synthèse) a contribué d'une part à acquérir des méthodes générales de chimie organique pour l'obtention d'un nombre important de dérivés d'estrogènes et d'autre part, à préparer des antigènes stéroïdiques. Les méthodes d'identification et de fractionnement chromatographique ont été particulièrement adaptables au problème des composés stéroïdiques. La microanalyse a pu être mise au point au fur et à mesure de l'évolution et de l'élargissement de ces méthodes bien que dans ses principes la chromatographie ait offert dès le départ des solutions aux nombreux problèmes de l'analyse stéroïdique.

La détermination sensible et spécifique des stéroïdes par radioimmunocompétition a permis une étude physiologique encore préliminaire dans le domaine des estrogènes urinaires non conjugués.

Dans le cadre général du laboratoire, les résultats obtenus dans ce travail pourraient permettre d'effectuer des synthèses de stéroïdes phénoliques radioactifs, d'utiliser les antigènes stéroïdiques en chromatographie d'affinité pour isoler les protéines réceptrices spécifiques de ces stéroïdes, les anticorps obtenus pouvant être utilisés dans un but d'investigation biologique en tant qu'activité anti-estrogènes.

BIBLIOGRAPHIE

1 - JAYLE M.F.
"Analyse des Stéroïdes hormonaux", Vol. I et II, Masson, Paris 1961.

2 - THEVENET M., HENRY R., FERMANIAN J.
Ann. Endocr. (Paris), 1963, 24, 773.

3 - BROWN J.B.
Biochem. J., 1955, 60, 185.

4 - LEEDS N.S., FUKUSHIMA D.K., GALLAGHER T.F.
J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 2943.

5 - HUFFMAN M.N., LOTT M.H.
J. biol. Chem., 1948, 172, 325.

6 - BIGGERSTAFF W.R., GALLAGHER T.F.
J. Org. Chem. 1957, 22, 1220.

7 - HUFFMAN M.N., DARBY H.H.
J. Amer. Chem. Soc., 1944, 66, 150.

8 - MUELLER G.P., JOHNS W.F.
J. Org. Chem., 1961, 26, 2403.

9 - HUFFMAN M.N.
J. biol. Chem., 1955, 217, 107.

10 - FISHMAN J., BIGGERSTAFF W.R.
J. Org. Chem., 1958, 23, 1190.

11 - PRELOG V., RUZICKA L., WIELAND P.
Helv. Chim. Acta, 1945, 28, 250.

12 - LANDOWNE R.A., LIPSKY S.R.
Anal. Chem., 1963, 35, 532.

13 - Van der MOLEN H.J., GROEN D., Van der MAAS J.H.
Steroïds, 1965, 6, 195.

14 - RADO A., DESFOSSES B., JAYLE M.F.
Eur. J. Steroids, 1967, 2, 317.

15 - ATTAL J., HENDELES S.M., EIK-NES K.B.
Anal. Biochem., 1967, 20, 394.

16 - KIRSCHNER M.A., TAYLOR J.P.
Anal. Biochem., 1969, 30, 346.

17 - EXLEY D., DUTTON A.
Steroids, 1969, 14, 577.

18 - JOHNSON W.S., JOHNS W.F.
J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 2005.

19 - MARQUET A., DVOLAITZKY M., KAGAN H.B., MAMLOK L., OUANNES C., JACQUES J.
Bull. Soc. Chim. (France) 1961, 10, 1822.

20 - SCHOLLER R., LEYMARIE P., HERON M., JAYLE M.F.
Acta Endocr., 1966, 52, suppl. 107.

21 - FINKELSTEIN M., MESTRIN S., KOCH W.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1947, 64, 64.

22 - ITTRICH G.
Zbl. Gynäk., 1960, 82, 429.

23 - TSWETT M.
Proc. Worsow. Soc. Nat. Sci. biol. Section 14, minute n°6, 1903.

24 - KUHN R., LEDERER E.
Ber., 1931, 64, 1349.

25 - MARTIN A.J.P., SYNGE R.L.M.
Biochem. J., 1941, 35, 1358.

26 - BATE-SMITH E.C., WESTALL R.G., BRADFIELD A.E.
Biochim. Biophys. Acta, 1950, 4, 427.

27 - MARTIN A.J.P.
Biochem. Soc. Symposia, Cambridge (England), 1949, 3, 4.

28 - LEDERER E., LEDERER M.
"Chromatography", 2nd Ed., Elsevier Publ., Amsterdam, 1957.

29 - LEDERER E.
"Chromatographie en Chimie organique", Vol. I et II, Masson, Paris 1961.

30 - DEMOLE E.
J. Chromatog., 1961, 6, 2.

31 - STAHL E.
"Dünnschicht Chromatographie", Springer, Berlin, 1962.

32 - RANDERATH K.
"Thin Layer Chromatography", Verlag Chemie, Weinheim, 1963.

33 - BUSH I.E.
"The Chromatography of Steroids", Pergamon Press, Oxford 1961.

34 - NEHER R.
"Steroid Chromatography", Elsevier, Amsterdam 1964.

35 - PASQUALINI J.R., JAYLE M.F.
J. Chromatog., 1961, 5, 336.

36 - OAKEY R.E.
J. Chromatog., 1962, 8, 2.

37 - AXELROD L.R.
J. biol. Chem., 1953, 201, 59.

38 - ROSENKRANTZ H.
Arch. Biochem. Biophys., 1953, 44, 1.

39 - OAKEY R.E.
Biochem. J., 1961, 81, 13.

40 - BREUER H., KNUPPEN R., PANGELS G.
Z. physiol. Chem., 1959, 317, 256.

41 - BREUER H., KNUPPEN R., PANGELS G.
Biochem. J., 1961, 79, 32.

42 - KNUPPEN R.
Z. Vitamin Hormon. Fermentforsch., 1963, 12, 355.

43 - KUSHINSKY S., DEMETRIOU J.A.
Steroïds, 1963, 2, 253.

44 - HAMILTON J.G., DIECKERT J.W.
Arch. Biochem. Biophys., 1959, 82, 212.

45 - MARKWARDT F.
Naturwiss., 1954, 41, 139.

46 - KECSKES L., MUTSCHLER F. , GLOS I., THAN E., FARKAS I., CEGLEDI I., KOBER I.
Acta Endocr., 1961, 38, 545.

47 - SMITH O.W.
Endocrinology, 1960, 67, 698.

48 - PIGON H., LUNAAS T., VELLE W.
Acta Endocr., 1961, 36, 131.

49 - DESFOSSES B., PASQUALINI J.R., JAYLE M.F.
In "Analyse des Stéroïdes hormonaux",(M.F. JAYLE), Vol. II, Masson, Paris 1962, p. 431.

50 - AXELROD L.R., PULLIAM J.E.
Arch. Biochem. Biophys., 1960, 89, 105.

51 - BARTON G.M., EVANS R.S., GARDNER J.A.F.
Nature 1952, 170, 249.

52 - MITCHELL F.L., DAVIES R.E.
Biochem. J., 1954, 56, 690.

53 - SIMPSON T.H., WRIGHT R.S.
Anal. Biochem., 1963, 5, 313.

54 - LONGCHAMPT J., JAYLE M.F.
In "Analyse des Stéroïdes hormonaux" (M.F. JAYLE),
Vol. II., Masson Paris 1962, p. 433.

55 - LADANY S., FINKELSTEIN M.
Steroïds, 1963, 2, 298.

56 - GOUSKOS A.D., DALEZIOS J.
Chim. Chronika, 1964, 29, 75.

57 - GOEBEL P.
Verhandl. Deut. Ges. Inn. Med., 1961, 67, 333.

58 - BARLOW J.J.
Anal. Biochem., 1963, 6, 435.

59 - ADLERCREUTZ H., LUUKKAINEN T.
Trans. Meet. Int. Study Group Steroids Hormones (2nd).,
Rome, 1965 - Publié en 1966.

60 - PORTER C.W., CLARKE E.L., BLOCK G.E.
J. Labor. and Clin. Med., 1959, 54, 471.

61 - MAHESH V.B.
Steroïds, 1964, 3, 647.

62 - NOCKE W., BREUER H., KNUPPEN R.,
Acta Endocrinol., 1961, 36, 393.

63 - KETZ H.A., WITT H., MITZNER M.
Biochem. Z., 1961, 334, 73.

64 - DEMOLE E.
J. Chromatog., 1958, 1, 24.

65 - STAHL E.,
Pharmazeutische Rundschau, 1959, 2, 1.

66 - LISBOA B.P., DICZFALUSY E.
Acta Endocrinol., 1962, 40, 60.

67 - STARKA L.
J. Chromatog., 1965, 17, 599.

68 - LUISI M., SAVI C., COLI F., MARESCOTTI V.
Folia Endocrinologica 1962, 15, 672.

69 - TUNG Y.C.
Nature 1965, 208, 581.

70 - LISBOA B.P.
Clin. Chim. Acta 1966, 13, 179.

71 - WOTIZ H.H., CHATTORAJ S.C.
Anal. Chem., 1964, 36, 1466.

72 - HERTELENDY F., COMMON R.H.
Steroids, 1963, 2, 135.

73 - TOUCHSTONE J.C., MURAWEC T., BRUAL O.
J. Chromatog., 1968, 37, 359.

74 - LISBOA B.P.
Acta Endocrinol., 1963, 43, 545.

75 - VARON H.H., DARNOLD H.A., MURPHY M., FORSYTHE J.
Steroids, 1967, 9, 507.

76 - LISBOA B.P., HEFTMANN E.
J. Chromatog., 1966, 21, 490.

77 - JACOBSOHN G.M.
Anal. Chem., 1964, 36, 275.

78 - JUNG L.
Rev. Fr. Et. clin. biol., 1963, 8, 406.

79 - FEHER K.G., CSILLAG M.
Clin. Chim. Acta 1967, 15, 343.

80 - VETTWILLER A., KELLER M.
Gynaecologia 1967, 163, 199.

81 - WOTIZ H.H, CHATTORAJ S,C.(1965) LIPSETT M,B. Ed, " Gas Chromatography of Steroids in Biological Fluids Plenum Press, New-York

82 - LUISI M., GARNICELLI A., GANIBASSI G., MENCHINI G.F.
Biochim. Biol. Sper., 1966, 5, 173.

83 - LUISI M., MARESCOTTI V.
Trans. Meet. Int. Study Group Steroids Hormones (2nd), Rome 1965, publié en 1966, p. 171.

84 - THIJSSEN J.H.H.
Steroids 1968, 11, 369.

85 - ATTAL J., HENDELES S.M., ENGELS J.A., EIK-NES K.B.
J. Chromatog., 1967, 27, 167.

86 - IDLER D.R.
Steroids 1966, 8, 867.

87 - CLAYTON R.B.
Nature 1961, 192, 564.

88 - KNIGTS B.A., THOMAS G.H.
Anal. Chem., 1962, 34, 1046.

89 - HARTMAN I.S., WOTIZ H.H.
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 90, 334.

90 - Van den HEUVEL W.J.A., HORNING E.C.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 64, 416.

91 - WOODFORD F.P., Van GENT C.M.
J. Lipid. Research, 1960, 1, 188.

92 - Van den HEUVEL W.J.A., SWEELEY C.C., HORNING E.C.
Biochim. Biophys. Research Communs, 1960, 3, 33.

93 - WOTIZ H.H., MARTIN H.F.
J. biol. Chem., 1961, 236, 1312.

94 - LUUKKAINEN T., ADLERCREUTZ H.
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 70, 700.

95 - WOTIZ H.H., CHATTORAJ S.C.
Anal. Chem., 1964, 36, 1466.

96 - DESFOSSES B.
Bull. Soc. Chim. (France) 1965, 6, 1889.

97 - DESFOSSES B., CONDOM R., EMILIOZZI R.
J. Chromatog., 1968, 38, 290.

98 - Van den HEUVEL W.J.A.
J. Chromatog., 1967, 28, 406.

100 - LANDOWNE R.A., LIPSKY S.R.
Anal. Chem., 1963, 35, 532.

101 - Van der MOLEN H.J., GROEN D., Van der MAAS J.H.
Steroids, 1965, 6, 195.

102 - CLARK S.J., WOTIZ H.H.
Steroids, 1963, 2, 535.

103 - ATTAL J., HENDELES S.M., EIK-NES K.B.
Anal. Biochem., 1967, 20, 394.

104 - RADO A., DESFOSSES B., JAYLE M.F.
Eur. J. Steroids, 1967, 2, 317.

105 - HORNING E.C., Van den HEUVEL W.J.A., CREECH B.G.
In : Methods of Biochemical Analyses, Vol. XI, D. GLICK Ed., Interscience, New York, 1963

106 - CHARRANSOL G., DESFOSSES B.
Eur. J. Steroids, 1967, 2, 423

107 - HARTMAN I.S.
Gas Chromatography in the Analysis of Steroid Hormones, H.H. WOTIZ, S.J. CLARCK, Plenum Press, N.Y. 1966

108 - SCHOLLER R., DEHENNIN L.
Journées Hellènes de Séparation immédiate et de Chromatographie. Pub. Union des Chimistes Hellènes III, 1965

109 - EXLEY D., DUTTON A.
Steroids, 1969, 14, 577

110 - LOVELOCK J.E.
Anal. Chem., 1963, 35, 474

111 - Van der MOLEN H.J., MAAS J.H., GROEN D.
Eur. J. Steroids, 1967, 2, 119

112 - LANDSTEINER K.
The Specificity of Serological Reactions, Thomas Springfield III, 1936

113 - ERLANGER B.F., BIESER S.M., LIEBERMAN S.
J. Biol. Chem., 1957, 228, 713

114 - LIEBERMAN S., ERLANGER B.F., BIESER S.M., AGATE F.J.
Recent. Progr. Hormone Research, 1959, 15, 165

115 - MIDGLEY A.R., NISWENDER G.D., RAM J.S.
Steroids, 1969, 13, 731

116 - BERSON S.A., YALOW R.S.
Nature (Lond.), 1959, 184, 1648

117/118 - ABRAHAM G.E., ODELL W.D., EDWARD S.R., PURDY J.M.
Steroids assay by Protein Binding, Second Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1970, p. 332

119 - MICKHAIL G., CHUNG H.W., FERIN M., Van de WIELE R.L.
Steroids Assay by Protein Binding, Second Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1970, p. 332

120 - GOODFRIEND L., SEHON A.H.
Canad. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 1177

121 - TULCHINSKY D., ABRAHAM G.E.
J.C.E.M., 1971, 33, 775

122 - FERIN M., ZIMMERING P.E., LIEBERMAN S., Van de WIELE R.L.
Endocrinology, 1968, 83, 565

123 - CALDWELL B.V., SCARAMUZZI R.J., TILLSON S.A., THORNEYCROFT I.H.
Immunologic Methods in Steroid Determination, F.G. PERON, B.V. CALDWELL Eds., Appleton Century Crofts Pub., New York 1970, p. 183

124 - THORNEYCROFT I.H., TILLSON S.A., ABRAHAM G.E., SCARAMUZZI R.J., CALDWELL B.V.
Immunologic Methods in Steroids Determination, F.G. PERON, B.V. CALDWELL Eds., Appleton Century Crofts Pub., New York 1970, p. 63

125 - KELLIE A.E., SAMUEL V.K., RILEY W.J., ROBERTSON D.M.
J. Steroids Biochem., 1972, 3, 275

126 - GROSS S.J.
Immunologic Methods in Steroids Determination, F.G. PERON, B.V. CALDWELL Eds., Appleton Century Crofts Pub., New York 1970, p. 41

127 - DRAY F., TERQUI M., DESFOSSES B., CHAUFFOURNIER J.M., MOWSZOWICZ I., KAHN D., ROMBAUTS P., JAYLE M.F.
C.R. Acad. Sci., 1971, 273, 2380

128 - de LAUZON S., DESFOSSES B., ROMBAUTS P., DRAY F., UHRICH F., JAYLE M.F.
C.R. Acad. Sci., 1972, 274, 3023

129 - EXLEY D.
Steroids, 1971, 18, 605

130 - JEFFCOATE S.L., SEARLE J.E.
Steroids, 1972, 19, 181

131 - KUSS E., GOEBEL R.
Steroids, 1972, 19, 737

132 - LINDNER H.R., PEREL E., FRIEDLANDER A., ZEITLING A.
Steroids, 1972, 19, 357

133 - KUSS E., GOEBEL R.
Steroids, 1972, 19, 509

134 - TAMAOKI H., MURASE Y., MINATO S., NAKANISHI K.
J. Biochem., 1967, 62, 1

135 - LONGWELL B., WINTERSTEINER O.
J. Biol. Chem., 1940, 133, 219

136 - MARRIAN G.F., SNEDDON A.
Biochem. J., 1960, 74, 430

137 - ABRAHAM G.E.
J. Clin. Endocr., 1969, 28, 866

138 - CHUNG C.W., LUNDY L.E.
Steroids, 1971, 18, 91

139 - MIDGLEY A.R., NISWENDER G.D.
Steroid Assay by Protein Binding, Second Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1970, p. 320

140 - GURPIDE E., GIEBENHAIN M.E., TSENG L., KELLY W.G.
Amer. J. Obstet. Gynec., 1971, 15, 897

141 - GROSS S.J., GRANT J.D., BENNETT R., WONG S.L., LOMAX P.
Steroids, 1971, 18, 555

142 - COHEN S.L., MARRIAN G.F., WATSON M.
Lancet, 1935, 228, 674

143 - SMITH G.V.S., SMITH O.W.
Amer. J. Physiol., 1938, 21, 98

144 - TAYLOR H.C., WARNER R., WELSCH C.A.
Amer. J. Obstet. Gynec., 1939, 38, 748

145 - WEHRS C.
Rev. Gin. Obstet. (Rio de J.), 1951, 1, 133

146 - SAITO J., NOMURA A.
Yonago Acta Med., 1955, 1, 143

147 - JAYLE M.F., SCHOLLER R., JARRIGE P., METAY S.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 1595

148 - SMITH O.W.
Acta Endocr. (Kobenhavn), supp. 1966, 3, 104

149 - ERIKSSON H., GUSTAFSSON J.A.
Eur. J. Biochem., 1970, 16, 268

150 - LONGCHAMPT J., DELORME J.
Pub. en cours

151 - DESFOSSES B., de LAUZON S., JUDAS O., JAYLE M.F.
Pub. en cours

152 - BRAY G.A.
Anal. Biochem., 1960, 1, 279

153 - MICKHAIL G., CHUNG H.W., FERIN M., Van de WIELE R.L.
Immunologic Methods in Steroids Determination,
F.G. PERON, B.V. CALDWELL Eds., Appleton
Century Crofts Pub., New York 1970, p. 113

154 - DICZFALUSY E., LAURITZEN C.
Oestrogene Beim Menschen, Springer Verlag,
Berlin-Gottingen-Heidelberg, 1961

155 - JAYLE M.F., CREPY O.
Gyn. Obstet., 1954, 53, 1

156 - ADLERCREUTZ H., LUUKKAINEN T.
Ann. Clin. Res., 1970, 2, 365

TABLE DES MATIERES

Introduction 1

Première partie

Chapitre I

I) Introduction et nomenclature 6

II) Synthèse de stéroides phénoliques de référence 10

III) Spectres de fluorescence 31

Chapitre II

Introduction 37

I) Chromatographie sur papier 41

II) Chromatographie en couche mince 69

III) Chromatographie en phase gazeuse 98

Deuxième partie 138

Chapitre I

I) Synthèse d'antigènes stéroidiques 139

II) Préparation d'immunsérums 153

III) Etude comparative des immunsérums 154

Chapitre II

Dosage des estrogènes libres urinaires ou plasmatiques chez la femme. 188

Conclusion 214

Bibliographie 215